

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
EPIDEMIOLOGIA E CONTROLLO DELLE ZONOSI
XXII Ciclo**

Settore scientifico-disciplinare: VET 05

**Esperienza all'interno di un progetto per la
realizzazione di un sistema di sorveglianza della
leishmaniosi canina in Emilia-Romagna**

**Presentata da:
Dott.ssa Daniela SALVATORE**

**Coordinatore del Dottorato:
Prof. Giovanni POGLAYEN**

**Relatore:
Prof. Raffaella BALDELLI**

Esame finale anno 2010

*Alla mia famiglia
e
al mio futuro (B.)*

INDICE

Introduzione	pag. 1
---------------------	---------------

I PARTE

Il problema “Leishmaniosi”

La leishmaniosi in Italia	pag. 3
Ciclo Biologico	pag. 5
Il vettore	pag. 6
Quadro epidemiologico italiano	pag. 8
Fattori chiave per la diffusione della Leishmaniosi	pag. 19
Sistemi di controllo: Geographic Information Systems (GIS)	pag. 22
Cos'è GIS?	pag. 22
Utilizzo del GIS in Medicina Veterinaria	pag. 25
Progetto per la realizzazione di un sistema di sorveglianza della leishmaniosi in Emilia-Romagna	pag. 28
Premessa alle parti sperimentali	pag. 31

PARTE SPERIMENTALE:

Realizzazione di una banca dati dei casi di LCan in cani di proprietà e loro georeferenziazione	pag. 32
Premessa	pag. 33
Materiali e Metodi	pag. 34
- Analisi descrittiva dei dati	pag. 34
- Analisi geografica e geostatistica dei dati	pag. 37
Risultati	pag. 38
Discussione e Considerazioni finali	pag. 64

II PARTE

La diagnosi della leishmaniosi

Premessa	pag. 70
La diagnosi della leishmaniosi canina	pag. 71
- Diagnosi clinica e differenziale	pag. 71
- Diagnosi di laboratorio	pag. 72
• Esami aspecifici	pag. 72
• Esami specifici	pag. 74

PARTE SPERIMENTALE:

Comparazione di metodiche sierologiche	pag. 102
Premessa	pag. 103
Materiali e Metodi	pag. 104
- Campioni in esame	pag. 104
- Immunofluorescenza Indiretta	pag. 104
- Elisa	pag. 105
- Western Blot	pag. 107
- Elaborazione statistica dei dati	pag. 111
Risultati	pag. 113
Discussione e Considerazioni finali	pag. 126
BIBLIOGRAFIA	pag. 131
Allegati	pag. 158
Ringraziamenti	pag. 182

INTRODUZIONE

La Leishmaniosi è una zoonosi protozoaria endemica in 88 Paesi, tra i quali molti Paesi dell'Europa meridionale. Nell'uomo si riportano soprattutto episodi della forma viscerale, forma pericolosa e mortale se non adeguatamente trattata. Si manifesta anche la forma cutanea, più benigna rispetto a quella viscerale. Si stima che l'incidenza della leishmaniosi umana sia compresa tra il 2% e il 49%, valori che corrisponderebbero a circa 700 nuovi casi ogni anno nell'area del Mediterraneo.

Per quanto riguarda la malattia nel cane, si registrano valori di sieroprevalenza variabili nei Paesi del bacino del Mediterraneo. Analizzando il quadro epidemiologico da est ad ovest si passa dal 20-25% di prevalenza osservato a Cipro ed in Grecia, al 2% dell'Italia continentale e il 15% dell'Italia peninsulare, alla Francia che riporta una media di sieroprevalenza compresa tra il 4 e il 20%, alla Spagna dove la prevalenza è di circa 8,5%, per arrivare al 20% riportato dal Portogallo (Dujardin *et al.*, 2008).

I PARTE

IL PROBLEMA “LEISHMANIOSI”

LA LEISHMANIOSI IN ITALIA

L'agente eziologico è rappresentato da protozoi flagellati appartenenti al Regno dei *Protisti*, Sottoregno *Protozoa*, *Phylum Sarcomastigophora*, *Subphylum Mastigophora*, Classe *Zoomastigophorea*, Ordine *Kinetoplastida*, Sottordine *Trypanosomatinae*, Famiglia *Trypanosomatidae*, Genere *Leishmania*.

In Italia l'infezione è causata dalla specie *Leishmania infantum*, unica presente sul territorio nazionale. Tale specie è responsabile della Leishmaniosi Viscerale Zoonotica (LVZ) dell'uomo mediante ceppi viscerotropi, della Leishmaniosi Cutanea Sporadica nell'uomo (LCS) mediante ceppi dermatropi e della Leishmaniosi canina (LCan) (Gramiccia e Gradoni, 2005).

Il cane rappresenta il serbatoio principale dell'infezione ma il parassita è stato isolato anche in altre specie: volpi, ratti, gatti, furetto in un'unica occasione (Brianti *et al.*, 2004) e uomo.

La volpe potrebbe avere un ruolo nella diffusione dell'infezione in zone rurali dove facilmente si verificherebbe il contatto tra cane, volpe e flebotomo; la volpe non è però ugualmente coinvolta nel mantenimento e nella diffusione dell'infezione in ambiente silvestre (Courtenay *et al.*, 2001).

Sebbene siano state registrate positività nel ratto in più occasioni, si è scettici nel pensare che possa fungere da serbatoio dell'infezione in quanto non è un ospite attraente per il flebotomo e la trasmissione si verifica solo al manifestarsi della sintomatologia; va inoltre considerato che il ratto ha una vita breve e che i sintomi potrebbero anche non manifestarsi quando l'animale è ancora in vita (Killick-Kendrick, 2002).

Il coinvolgimento del gatto nell'epidemiologia dell'infezione non è ancora del tutto chiarito in quanto si incontrano difficoltà nell'esecuzione della xenodiagnosi, indispensabile per valutare l'infettività dell'animale per il vettore. Indagini sierologiche condotte in varie regioni italiane hanno comunque evidenziato valori di prevalenza tra lo 0,9% (Mancianti, 2004) e il 68% (Pennisi *et al.*, 1998; Pennisi *et al.*, 2000).

L'uomo immunocompetente è un ospite a fondo cieco in quanto sviluppa una risposta immunitaria adeguata che non permette la diffusione del patogeno a

livello del circolo sanguigno e del derma; diversa è la situazione del soggetto immunodepresso che può fungere anche da sorgente di infezione per il vettore (Gradoni, 1999; Macrì, 1999).

I ceppi isolati vengono caratterizzati mediante la tecnica di tipizzazione isoenzimatica che consiste in un'elettroforesi su gel sul quale vengono esaminati i promastigoti, opportunamente trattati, nei confronti degli enzimi di riferimento. Le bande elettroforetiche ottenute vengono poi comparate con quelle dei ceppi di riferimento forniti dall'OMS (Gramiccia, 1997). Tramite la tipizzazione isoenzimatica i ceppi vengono inseriti all'interno di unità tassonomiche dette "zimodemi"; i singoli zimodemi comprendono tutti gli isolati del parassita che mostrano la stessa mobilità elettroforetica per un numero definito di enzimi (Gramiccia *et al.*, 2004).

Sul territorio nazionale e nel Mediterraneo, la maggior parte dei casi di LVZ e di LCan è causata da ceppi appartenenti allo zimodema MON-1, mentre i ceppi responsabili della LCS si concentrano principalmente all'interno dello zimodema MON-24.

Particolare caso è quello del focolaio campano dove nel 48% dei casi le infezioni sono causate da ceppi appartenenti allo ZMON-1, ma nel restante 52% si tratta di ceppi appartenenti allo ZMON-72, isolati, esclusivamente all'interno di tale focolaio, nell'uomo, nel cane e nel flebotomo (Gradoni *et al.*, 1996).

Sono da riportare anche le segnalazioni di casi di LVZ e LCS causati da ceppi appartenenti a zimodemi diversi da quelli maggiormente circolanti sul territorio nazionale: nel caso della LVZ si ricordano MON-27 e MON-187, in riferimento alla LCS si menzionano MON-29, MON-33, MON-78, MON-111 (Gradoni *et al.*, 1993; Gradoni e Gramiccia, 1994; Gramiccia, 1997; Deruere *et al.*, 1999).

Una considerazione a parte va fatta per le infezioni riguardanti soggetti immunodepressi HIV+, interessati da co-infezioni HIV/*L. infantum*; in questi casi è possibile isolare ceppi appartenenti a zimodemi diversi.

In uno studio condotto su 227 isolati italiani da soggetti immunodepressi, è stata evidenziata la circolazione degli zimodemi MON-29, MON-136, MON-

185, MON-188, MON-190, MON-201, MON-228 e MON-189, alcuni dei quali già isolati in pazienti HIV+ di altri Paesi europei (Gramiccia, 2003).

CICLO BIOLOGICO

Affinché l'infezione sia mantenuta in natura, il parassita necessita di due ospiti: uno vertebrato, che funge da serbatoio dell'infezione in cui il parassita si trova in forma amastigote (Fig.1), e uno invertebrato, che rappresenta il vettore e nel quale si ritrova la forma promastigote (Fig.2) del parassita, infettante per i vertebrati.

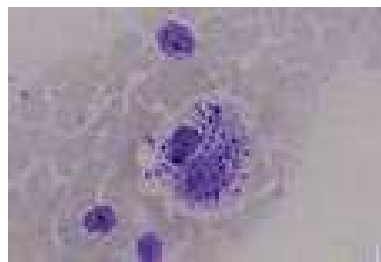
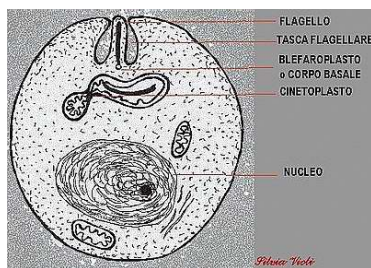


Figura 1 (destra): Rappresentazione della forma amastigote (www.leishmania.org); (sinistra): amastigoti all'interno di macrofagi in un preparato citologico (www.antropozoonosi.it)

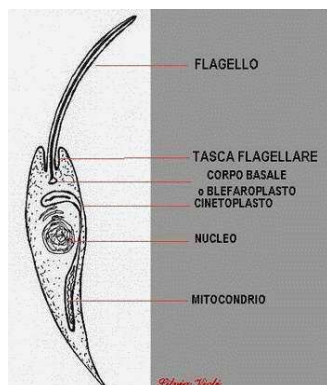


Figura 2 (destra): Rappresentazione schematica della forma promastigote (www.leishmania.org); (sinistra): promastigote in coltura (www.antropozoonosi.it)

La circolazione dell'infezione è a carico delle femmine ematofaghe delle specie vettrici che inoculano i promastigoti nell'ospite durante il pasto di sangue, necessario per la maturazione delle uova. Una volta penetrato, una serie di

meccanismi evita che il parassita fagocitato venga distrutto ed eliminato. Il passo successivo è la trasformazione nella forma amastigote, che replica per scissione binaria nei macrofagi dell'ospite: in questo modo si ha una massiva localizzazione delle cellule parassitate nel sangue periferico e a livello cutaneo; ciò permette la trasmissione del protozoo al vettore durante il pasto di sangue, quando la femmina si infetta ingerendo i macrofagi parassitati.

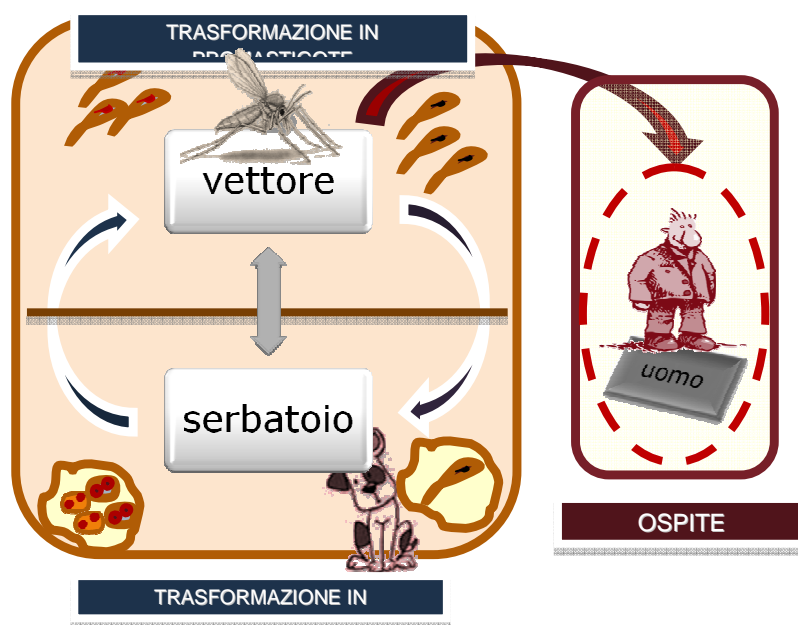


Figura 3: Rappresentazione schematica del ciclo biologico di *L. infantum*

IL VETTORE

Nel bacino del Mediterraneo la circolazione dell'infezione è mantenuta da ditteri appartenenti al genere *Phlebotomus*.

In Italia, solo *P. perniciosus* e *P. perfiliewi* sono vettori provati di leishmaniosi: il primo è il vettore principale dell'infezione su tutto il territorio nazionale, mentre il secondo è diffuso soprattutto sul versante adriatico degli Appennini (Maroli, 1999; Capelli *et al.*, 2004; Gramiccia *et al.*, 2004). I due vettori hanno distribuzione geografica diversa anche in virtù delle loro caratteristiche

biologiche. *P. perniciosus* è presente sia in aree urbane, periurbane e rurali, sia in ambienti domestici, peridomestici e selvatici, è in grado di resistere anche in condizioni ambientali non favorevoli, si nutre su qualsiasi mammifero, è sia antropofilo che zoofilo. Tutti questi aspetti concorrono a farne la specie maggiormente responsabile della diffusione del parassita nel bacino del Mediterraneo (Pozio *et al.*, 1985; Bongiorno *et al.*, 2002).

P. perfiliewi è diffuso soprattutto sul versante adriatico degli Appennini, ma è stato rinvenuto anche in Toscana, Calabria e Sicilia (Romi *et al.*, 1994). A differenza di *P. perniciosus*, preferisce l'habitat domestico ed è essenzialmente zoofilo.

Successivamente al suo ritrovamento in focolai del nord Italia è al vaglio anche la possibilità di includere tra i vettori di leishmaniosi in Italia *P. neglectus* (Maroli *et al.*, 1995; Maroli *et al.*, 2002), già vettore provato di leishmaniosi nel Montenegro (Ivović *et al.*, 2004) e in Grecia (Chianotis *et al.*, 2000; Ivović *et al.*, 2007).



Figura 4: Flebotomo (www.antropozoonosi.it)

QUADRO EPIDEMIOLOGICO ITALIANO

Ancor prima che Leishman ne identificasse l'agente eziologico nell'uomo, la malattia in forma viscerale era già conosciuta in Italia alla fine dell'800 e presente soprattutto nell'area vesuviana e ad Ischia. Fino al dopoguerra diverse sono le segnalazioni della forma viscerale dell'infezione, tanto che l'Italia veniva considerata un importante focolaio, con centri principali a Catania, Napoli e Palermo. Nel dopoguerra si osserva un calo delle segnalazioni in concomitanza all'utilizzo del DDT e di altri antiparassitari in campo agricolo (Pampiglione, 1974). A partire dagli anni '80 si assiste nuovamente ad un aumento dei casi adulti sul territorio nazionale, passando da circa 40 segnalazioni all'anno durante gli anni '80 a più di 200 nel 2000 (Gradoni *et al.*, 2003).

Diversi fattori hanno determinato il riemergere della malattia nell'uomo: cambiamenti climatici favorevoli al flebotomismo, diffusione dell'infezione nel serbatoio canino, aumento degli individui immunocompromessi con conseguente fenomeno delle co-infezioni leishmania/HIV, che hanno interessato, oltre all'Italia, anche Spagna e Francia.

Dalla seconda metà degli anni '90, in conseguenza dell'impiego delle nuove terapie anti-HIV, il problema delle co-infezioni è stato ridimensionato, passando da una trentina di casi a 5-6 casi all'anno.

Un caso a se stante è costituito dal focolaio campano dove sono stati registrati fino a 60 nuovi casi annui di LVZ, quasi tutti in adulti immunocompetenti, facendone quindi il principale focolaio del Mediterraneo.

Gli ultimi dati ufficiali sulla diffusione di LVZ in Italia si riferiscono al 2007 e riportano di 104 casi. Le regioni nelle quali si è avuto il maggior numero di notifiche sono state il Lazio, la Campania, a conferma della presenza del più importante focolaio umano del Mediterraneo e la Toscana. In riferimento all'Emilia-Romagna, i 4 casi sono stati osservati nelle province di Modena, Parma, Reggio Emilia e Rimini.

La situazione nelle singole regioni è riportata nella Tabella 1 (Bollettino Epidemiologico Nazionale, 2007).

Classi di età	0-14		15-24		25-64		>=65		ETA' NON NOTA			TOTALE			
Regione	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	N.N.	M	F	N.N.	TOT.
PIEMONTE	0	0	0	0	1	2	0	1	0	0	0	1	3	0	4
VALLE D'AOSTA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LOMBARDIA	1	0	0	0	5	0	1	0	0	1	0	7	1	0	8
PROV. AUTON. BOLZANO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PROV. AUTON. TRENTO	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
VENETO	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2
FRIULI VENEZIA GIULIA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIGURIA	0	1	2	0	2	0	2	1	1	0	0	7	2	0	9
EMILIA ROMAGNA	1	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	4	0	0	4
TOSCANA	1	1	1	0	3	0	2	1	0	1	0	7	3	0	10
UMBRIA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MARCHE	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1
LAZIO	2	2	1	0	11	4	2	1	0	0	0	16	7	0	23
ABRUZZO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MOLISE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CAMPANIA	3	1	1	0	10	6	1	0	0	0	0	15	7	0	22
PUGLIA	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2
BASILICATA	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	2
CALABRIA	0	0	0	0	3	3	0	0	0	0	0	3	3	0	6
SICILIA	1	1	1	0	4	0	0	0	0	0	0	6	1	0	7
SARDEGNA	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	3	0	0	3
ITALIA	10	7	6	0	46	15	12	5	1	2	0	75	29	0	104

Tabella 1: Dati nazionali dei casi notificati di LVZ, anno 2007 (Bollettino Epidemiologico Nazionale)

La LCS ha una distribuzione in generale sovrapponibile a quella della LVZ. Ci sono comunque delle zone particolarmente colpite nelle quali si registrano focolai di una certa importanza, come quelli dell'Abruzzo, della Calabria e della Sardegna (Gramiccia, 1997).



Figura 5: Distribuzione della LVZ e della LCan in Italia alla fine degli anni'80 (Istituto Superiore di Sanita, Roma)

La LVZ e la LCan hanno un areale di distribuzione sovrapponibile (Maroli, 2004).

Fino agli anni '80 la LCan era endemica nelle Regioni del centro-sud e nelle Isole, mentre il nord risultava sostanzialmente indenne dall'infezione, ad eccezione della Liguria e di una piccola parte dell'Emilia-Romagna. I focolai si presentavano con distribuzione discontinua in tutte le zone rurali o periurbane della fascia costiera tirrenica e nelle aree collinari ad ovest della dorsale appenninica fino ad una altitudine di 500-600 metri sul livello del mare, nelle regioni costiere e sub-appenniniche dello Ionio e del basso Adriatico e nelle isole. In queste aree la distribuzione si presentava a "macchia di leopardo", con aree di infezione a bassa prevalenza accanto a zone ad alta prevalenza (Gradoni, 1996).

La situazione epidemiologica nelle varie regioni d'Italia è ben documentata dalla produzione scientifica e, analizzando la situazione da sud a nord, si osserva come la diffusione dell'infezione è andata aumentando progressivamente.

In **Sicilia** la leishmaniosi è endemica su tutto il territorio. Nella città di Palermo la sieroprevalenza è aumentata progressivamente passando dal 1,5% al 32% in circa 10 anni (Mansueto *et al.*, 1982; Vesco *et al.*, 1990). L'elevata sieropositività osservata nei cani cittadini e la cattura di *P. perniciosus* hanno portato a concludere che la trasmissione della malattia si potesse verificare anche nella stessa area urbana (Maroli *et al.*, 1990). Elevate prevalenze sono state osservate anche in altre città siciliane: 33,6% ad Agrigento, 33,9% a Caltanissetta, 33,5% Catania, 57,1% Messina, 46,3% Trapani (Vesco *et al.*, 1998).

Anche in **Calabria** si è osservato lo stesso andamento rilevato in Sicilia: nel ventennio '60-'80 la sieroprevalenza è passata dal 2,7% all'8,3% nei cani da caccia (Catarsini, 1981); un lavoro successivo di Romano *et al.* (1990) riferisce invece di una prevalenza del 37%.

Per quanto riguarda la **Basilicata**, dopo le prime segnalazioni del 1958/1959 che riportavano una prevalenza del 2%, Colella e Casamassina (1979), osservano una prevalenza del 12,4%, spiegando l'aumento con il drastico calo degli effetti residui delle campagne di disinfestazione per la lotta antimalarica, che molto probabilmente avevano influito positivamente anche nei confronti della leishmaniosi.

In **Puglia**, un'indagine condotta da Bucci *et al.* (1975) su 404 sieri di cane residenti nella provincia di Foggia rileva una percentuale di positività in Immunofluorescenza Indiretta (IFI) che va dal 5,5% nella zona del Tavoliere delle Puglie, al 10,2% per la zona del promontorio del Gargano. Un'indagine successiva effettuata nel medesimo territorio, a seguito della segnalazione di 4 casi di LVZ, ha evidenziato una sieroprevalenza del 14% (Brandonisio *et al.* 1990).

La prima segnalazione di leishmaniosi canina in **Molise** è opera di Mastropietro nel 1953, che diagnosticò l'infezione in un cane lupo di 2 anni che presentava lesioni cutanee alla testa. Nel 1991 Ciarallo conduce un'indagine di ampio

respiro sul 15% della popolazione canina stimata del territorio di Campobasso, ed evidenzia una prevalenza media del 24,6%.

Il dato viene confermato da Baldelli e Di Francesco (1992) quando, svolgendo una indagine sierologica su 793 cani provenienti da diverse regioni italiane, individuano una prevalenza del 23,2% per i cani molisani e abruzzesi.

In **Campania** la prima segnalazione dell'infezione nel cane risale al 1940 (Pozio *et al.*, 1985), ma passano più di trenta anni prima che la malattia venga nuovamente descritta. A partire dagli anni '80 si ha un quadro più chiaro della situazione epidemiologica, con segnalazioni di casi nell'uomo e nel cane (Baldi *et al.*, 2004), nei quali si nota oltre alla circolazione di ceppi appartenenti allo zimodema MON-1, il più diffuso in tutto il bacino del Mediterraneo, anche quella di ceppi appartenenti allo zimodema MON-72, tipico solo della Campania (Gramiccia *et al.*, 1992).

Nel **Lazio**, Lillini *et al.* (1979) ritrovano un'alta percentuale di positività per LCan nella città di Roma (24,8%); un lavoro simile, effettuato in altre province della regione, riporta una prevalenza media del 14% (Cavallina *et al.*, 1989).

In riferimento alla situazione dell'**Abruzzo** si riporta il dato osservato da Baldelli e Di Francesco (1992), in cui si faceva riferimento ad una sieroprevalenza complessiva del 23,2%. A questo dato si aggiungono le osservazioni di Dalla Villa e Ruggeri (1999), che riportano il 15,3% di positività su 333 di cani di proprietà esaminati.

In **Umbria** Polidori *et al.* (1980) trovano una positività del 5% nella popolazione canina randagia della città di Terni. Moretti *et al.* (1995) nella provincia di Perugia, riportano un risultato ben più allarmante con il 19% di positività nella popolazione canina randagia sottoposta a controllo sierologico mediante IFI. Uno studio più ampio condotto nel 1996 da Moretti *et al.*, su cani provenienti da varie zone della regione, evidenzia una prevalenza che oscilla tra il 3% a Terni e il 17% a Perugia, con una distribuzione dell'infezione in microfoci.

In **Toscana**, nei due focolai storici in provincia di Grosseto, a Bacinello nell'entroterra toscano, e nell'Argentario, sulla costa sono stati evidenziati valori di prevalenza molto diversi tra loro: 3% a Bacinello e 24% all'Argentario. La differenza sarebbe da ascrivere alla diversa popolazione di flebotomi nelle due

aree: nell'Argentario maggior presenza di *P. perniciosus*, vettore più efficiente nella trasmissione dell'infezione, a Bacinello principalmente presenza di *P. perfiliewi* (Gradoni *et al.*, 1980). Per quanto concerne la provincia di Livorno, Mancianti *et al.* (1985) segnalano una prevalenza del 19% in Val di Cornia. Altro focolaio importante del livornese è quello dell'Isola d'Elba. Uno studio di Mancianti *et al.* (1986) riporta una prevalenza del 19%, sottolineando una maggiore presenza dell'infezione nelle zone pianeggianti e collinari (39,6% e 17,3%, rispettivamente) rispetto a quanto osservato in montagna (2,5%-7%).

A Firenze e provincia Andreani *et al.* (1995) riportano una percentuale di positività del 27,8%, che di poco supera quanto già individuato da Palarchi *et al.* (1979). Nella Provincia di Pisa, libera dall'infezione fino al 1990, si ritrova una prevalenza del 24% nel 1995 (Andreani *et al.*, 1995).

Relativamente alla situazione dell'**Emilia-Romagna**, a partire dagli anni '80 si osservano sempre più frequentemente casi autoctoni di LCan. Mantovani *et al.* (1982) accertano una sieropositività dell'1,6% in cani residenti nel territorio in provincia di Bologna, interessato all'inizio degli anni '70 da un grave episodio di LVZ (Pampiglione, 1974).

A partire da quell'episodio, l'attento monitoraggio sul territorio regionale ha portato ad evidenziare i primi casi autoctoni, la maggior parte dei quali residenti in zone limitrofe al focolaio sopracitato (Baldelli e Di Francesco, 1992 e 1997).

In **Liguria** Mignone *et al.* (1991 a e b) hanno evidenziato la presenza di due focolai: uno nel territorio compreso tra Ventimiglia e Bordighera, con una prevalenza del 30% probabilmente collegato al focolaio francese della Costa Azzurra; l'altro, con il 50% di sieroprevalenza, si estende da San Lorenzo al Mare a Imperia fino a Cervo e Savona, propagandosi anche nell'entroterra. Le indagini estese ai canili di Imperia, Sanremo e Ventimiglia, hanno evidenziato sieropositività diverse, ad indicare la presenza all'interno di un macro-focolaio, di micro-focolai caratterizzati da parametri ecologici particolari che facilitano la trasmissione della malattia e causano frequenze di infezioni elevate accanto a zone dove le frequenze sono basse.

A partire dagli anni '90 nelle aree storicamente endemiche si osserva l'ampliamento, in termini di prevalenza e incidenza, e la diffusione sul territorio dei focolai già esistenti, ai quali se ne aggiungono di nuovi.

In **Umbria**, Diaferia *et al.* (2005) osservano una sieroprevalenza complessiva del 16% su 1204 cani controllati, il 58% dei quali non si erano mai allontanati dalla zona, con un aumento dell'incidenza in entrambe le province controllate.

In una indagine effettuata nel Lazio, tra il 2001 e il 2004, su circa 35000 sieri di cani di proprietà e ricoverati nei canili, Macrì *et al.* (2005) riportano le seguenti prevalenze: 23,9% nella provincia di Frosinone, 35% in quella di Latina, 34,5% nella provincia di Rieti, 24,5% nella provincia di Roma e 30,5% nella provincia di Viterbo. La presenza di un nuovo focolaio in provincia di Roma, con una prevalenza di infezione del 38%, era stata segnalata da Rossi *et al.* nel 2004.

L'espansione del problema riguarda anche le regioni più meridionali.

In Campania, ai focolai noti da tempo nell'area vesuviana e nell'Isola d'Ischia, se ne sono aggiunti altri di natura ectopica, creati dallo spostamento di cani infetti, caratterizzati da endemia instabile, bassa densità del vettore e prevalenza contenuta nella popolazione canina (Baldi *et al.*, 2004).

In **Calabria** Poglayen *et al.*, tra il 1997 e il 2004 (2005 b), su 1797 cani randagi della provincia di Cosenza riportano una range di positività compreso tra il 2% e l'8%.

Nella provincia di Agrigento Poglayen *et al.* (2005 a), osservano una sieroprevalenza del 55% tra i cani di proprietà, e del 31% in soggetti ospitati in canile.

La vera novità è rappresentata dai focolai autoctoni segnalati nelle regioni del Nord-Italia precedentemente indenni dall'infezione.

In Liguria tra il 1990 e il 1994 Zaffaroni *et al.* (1999) analizzando 21000 sieri di cani della provincia di Imperia e Savona, rilevano sieroprevalenze comprese tra il 22% e il 30%. Si stabilisce così per la zona una situazione di elevata endemia a conferma di quanto già emerso nei lavori di Mignone *et al.* del 1991.

Nel 1993 viene individuato il primo focolaio di infezione in **Veneto**, in Valpolicella, nella provincia di Verona (Poglayen *et al.*, 1997), all'interno del quale viene evidenziata la presenza dei vettori *P. perniciosus* e *P. neglectus*,

quest'ultimo ritrovato per la prima volta nel nord Italia (Maroli *et al.*, 1995; Maroli *et al.*, 2002). A partire da questa prima segnalazione sono state condotte indagini sierologiche su cani provenienti da tutto il territorio regionale, che hanno confermato l'esistenza del focolaio, ma anche una diminuzione della prevalenza: dal 25% al 10%, probabilmente da ascrivere all'individuazione precoce di cani sieropositivi, ma asintomatici, sottoposti a trattamento farmacologico (Piccoli *et al.*, 1999).

A partire dal 1998 la LCan fa la sua comparsa in **Piemonte** quando diversi casi vengono segnalati in provincia di Torino. Otto di questi localizzati in una zona collinare limitrofa alla città, si confermano casi autoctoni (Rossi *et al.*, 1999). Tale focolaio nel tempo si è stabilizzato ed ampliato e successive indagini hanno messo in evidenza casi autoctoni anche nei comuni di Moncalieri, Ivrea, Casale Monferrato, Biella, Cuneo, Alessandria e in provincia di Aosta (Ferroglia *et al.*, 2002; Maroli *et al.*, 2002; Ferroglia *et al.*, 2005). In tale area è stata osservata la presenza di vettori appartenenti alle specie *P. perniciosus* e *P. perfliewi* ma non è possibile sapere se tali specie siano sempre state presenti nel territorio o se siano di recente introduzione.

Relativamente alla situazione dell'Emilia-Romagna si ricorda il focolaio in provincia di Rimini, inizialmente limitato ad un'area collinare tra i comuni di S. Giovanni in Marignano e Saludecio, dove sono state rilevate prevalenze del 2,9% e 6,2%, rispettivamente, ed è stata accertata la presenza preponderante di *P. perfliewi* rispetto a *P. perniciosus* (Baldelli *et al.*, 1999; Baldelli *et al.*, 2001).

Attualmente tale focolaio si è diffuso su tutto il territorio della provincia, privilegiando le aree collinari a ridosso della costa (Baldelli, comunicazione personale).

Un altro focolaio autoctono stabile è stato evidenziato nei comuni di Castel San Pietro Terme e Ozzano Emilia, territorio interessato dal focolaio umano del 1971. Uno studio epidemiologico, condotto in tali comuni per 2 anni consecutivi, ha evidenziato nel 2001 prevalenza di infezioni del 4,3% nel comune di Castel San Pietro Terme e del 2,7% nel comune di Ozzano Emilia. In quest'ultimo, l'anno successivo, si registrava un aumento della prevalenza

all'11,2%, con un tasso di incidenza del 9,3% (Mollicone e Baldelli, 2003; Mollicone *et al.*, 2003).

In considerazione della nuova situazione epidemiologica che si stava delineando nel Nord Italia, nel 2002 si istituisce il network scientifico *LeishMap*TM con l'obiettivo principale di monitorare la diffusione dell' infezione e dei vettori nel nord Italia durante il biennio 2003-2005. Le regioni incluse nello studio sono state: Piemonte, Valle d'Aosta, Lombardia, Emilia-Romagna, Veneto, Trentino Alto-Adige e Friuli Venezia Giulia. Il network era costituito da 4 unità operative: il Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale dell'Università di Bologna, il Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia dell'Università di Torino, il Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica dell'Università di Milano e il Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie dell'Università di Padova. Le attività venivano coordinate dal Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate (reparto di Malattie Trasmesse da Vettori e Sanità Internazionale) dell'Istituto Superiore di Sanità. Gli obiettivi che il gruppo si era posto sono così riassumibili:

1. Identificare i nuovi casi autoctoni nel nord Italia;
2. Monitorare la presenza e la densità dei vettori in queste aree;
3. Verificare l'espansione dei focolai stabili di LCan identificati precedentemente.

Durante il periodo di attività del *LeishMap*TM sono stati controllati circa 5400 cani di cui 106 (2,1%) sono risultati casi autoctoni. Per i soggetti positivi sono stati osservati titoli anticorpali compresi tra 1:40 e 1:1280. Nell'area collinare della valle del Po è stata registrata una sieroprevalenza complessiva del 2,6%, significativamente più alta di quella riportata nella regione pre-alpina (1,8%). E' stato possibile anche l'isolamento di 8 ceppi di *Leishmania*, tutti identificati come *L. infantum* MON-1.

Le indagini entomologiche condotte in tutte le aree di sorveglianza hanno accertato la presenza di *P. perniciosus*, sia nelle zone pre-Alpine che in quelle collinari della valle del Po. La presenza di *P. neglectus* è stata osservata prevalentemente nell'area pre-appenninica (Maroli *et al.*, 2008).

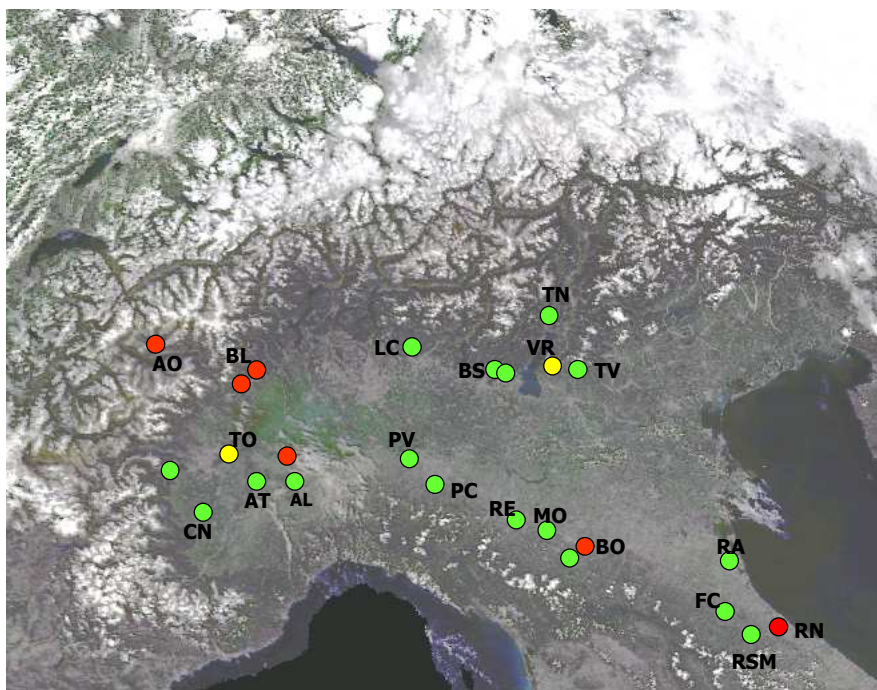


Figura 6: Distribuzione focolai nel Nord Italia. In **giallo** i focolai segnalati nella seconda metà degli anni Novanta, in **rosso** i focoli segnalati prima del 2003, in **verde** quelli segnalati dopo il 2003. (Rossi *et al.*, 2005 modificato).

I risultati ottenuti dal network scientifico *LeishMap*TM hanno evidenziato un nuovo quadro epidemiologico che interessa tutte le regioni del nord Italia e che è stato confermato da ulteriori indagini.

In Lombardia, un'indagine condotta su 110 cani di proprietà, ha permesso di individuare un focolaio peridomestico nelle vicinanze di Brescia, con una prevalenza del 6,3% (Mortarino *et al.*, 2004). Nel Triveneto, nell'area dei Colli Euganei è stata accertata la presenza di focolai autoctoni con prevalenze relativamente alte; la presenza del focolaio è stata confermata anche dalla presenza di vettori (Cassini *et al.*, 2007; Maroli *et al.*, 2008). Ulteriori focolai, sono stati individuati in Valle d'Aosta e Piemonte, dove è stata osservata una sieroprevalenza compresa tra lo 0,4% e il 5,8% e confermata la presenza di specie vettrici competenti (Ferroglia *et al.*, 2005). Ai casi segnalati a Torino, Ivrea e Casale del 2002, va aggiunto anche il risultato ottenuto da Vio *et al.* (2006), che nel tortonese, a seguito della segnalazione di 2 cani positivi per *L.*

infantum, hanno condotto uno studio su 129 animali provenienti da 15 comuni del sistema collinare tortonese, rilevando una positività del 2,3%; all'indagine sierologica è stato affiancato il controllo entomologico della zona che ha accertato la presenza oltre che di *P. perniciosus*, di *Sergentomya minuta*, che non ha importanza epidemiologica per la diffusione della LCan in quanto si nutre abitualmente sui rettili, e di *P. mascittii*, che pur nutrendosi sui mammiferi non sembra svolgere una azione vettoriale. Per quanto riguarda la situazione dell'Emilia-Romagna, la prevalenza media rilevata è stata del 2,6% considerando i soli casi autoctoni.

Oltre alla conferma del focolaio nella zona collinare tra Ozzano Emilia e Castel San Pietro Terme, messo in evidenza già alla fine degli anni '90 (Mollicone *et al.*, 2003) è stata accertata la presenza di nuovi focolai nel Comune di Monteveglio in provincia di Bologna, e nelle province di Modena e Piacenza. Casi autoctoni sporadici sono stati segnalati nell'Alta Valle del Reno, in provincia di Bologna, Forlì-Cesena, Ravenna e Reggio Emilia. L'indagine entomologica sul territorio emiliano-romagnolo ha ribadito l'associazione di *P. perniciosus* a *P. perfiliewi*, quest'ultimo presente ad elevata densità, costante questa dei focolai emiliano-romagnoli (Killick-Kendrick *et al.*, 1977; Baldelli *et al.*, 1999; Baldelli *et al.*, 2001).



Figura 7: Focolai e casi autoctoni di LCan in Emilia –Romagna

FATTORI CHIAVE PER LA DIFFUSIONE DELLA LEISHMANIOSI

La diffusione della leishmaniosi dipende dalla presenza del suo principale serbatoio, il cane, e del vettore competente che permette il passaggio dell'infezione da un soggetto ad un altro. E' proprio quest'ultimo elemento ad essere chiamato in causa per spiegare il cambiamento di scenario nell'epidemiologia della malattia.

Negli ultimi anni si è assistito ad un aumento della distribuzione della popolazione vettoriale, oltre che ad un aumento della sua densità. I mutamenti climatici verificatisi hanno certamente giocato un ruolo chiave in merito. Il cambiamento è stato particolarmente sentito nelle aree temperate dove l'aumento della temperatura ha contribuito a rendere più breve lo stadio larvale del vettore; ciò ha comportato la presenza di un numero maggiore di flebotomi adulti in grado di diffondere l'infezione durante la stagione di trasmissione. Allo stesso tempo, l'aumento delle temperature ha comportato un allungamento delle stagioni durante le quali i flebotomi rimangono attivi. I mutamenti climatici, oltre che sulla densità dei vettori, hanno contribuito anche a modificare la loro distribuzione. Si è infatti assistito alla colonizzazione di zone che si trovano a latitudini, mai interessate prima di allora dalla presenza dei flebotomi (Maroli *et al.*, 2008).

Si ha prova di questo cambio di scenario nella letteratura scientifica. In riferimento all'Italia, Biocca *et al.* (1977), in una indagine effettuata tra il 1965 e il 1974, avevano riscontrato che solo il 6,7 % dei siti investigati erano positivi per la presenza di flebotomi, ma una serie di studi condotti a partire dagli anni '90 hanno dimostrato che la situazione stava cambiando. Infatti non solo si è avuto un crescendo di segnalazioni di esemplari appartenenti alla specie *P. perniciosus*, ma a queste si sono sommate numerose segnalazioni di *P. neglectus*, soprattutto nelle zone subalpine.

I cambiamenti sono stati avvertiti anche al di fuori dei confini nazionali.

Già nel 1996 Cross e Hyams analizzarono i dati registrati in 115 stazioni meteorologiche distribuite in vari Paesi del sud-est asiatico, tra i quali Arabia Saudita, Kuwait e Yemen, per mettere a punto un modello di previsione sugli effetti che l'innalzamento della temperatura avrebbe potuto avere sulla diffusione di *L. donovani* e di *P. papatasi*, di cui è vettore, nei territori indagati. Si osservò che il 61% delle stazioni meteorologiche si trovava in zone che potenzialmente sarebbero potute diventare endemiche.

Più recentemente, Aspöck *et al.* (2007) hanno paragonato i parametri climatici delle aree nelle quali la presenza dei flebotomi è nota da tempo, con quelli dell'Austria. L'analisi dei dati fa ipotizzare che l'innalzamento della temperatura nella regione potrebbe favorire la diffusione di diverse specie vettrici sul territorio austriaco.

Il cambiamento climatico ha coinvolto anche la Francia (Dereure *et al.* 2009). Nel 1994 gli Autori avevano effettuato un'indagine sieropidemiologica in due zone dei Pirenei francesi, osservando una prevalenza dell'11,7% nei cani provenienti dalla valle e una dell'1,43% per i cani di collina. Contemporaneamente il monitoraggio entomologico aveva sottolineato la presenza di esemplari di *P. ariasi* e *P. perniciosus*. A distanza di anni, l'area indagata è stata oggetto di un nuovo studio, durante il quale le percentuali di prevalenza nelle due zone si sono pressoché invertite (2,7% per i cani residenti a valle e del 11,3% per quelli residenti in collina). Il fenomeno viene spiegato da un lato con una buona attività profilattica, dall'altra con l'innalzamento della temperatura e il conseguente aumento della popolazione vettoriale nelle zone collinari e quindi un maggior rischio per la diffusione dell'infezione.

Un'indagine simile condotta nel sud-est della Spagna ha rilevato un incremento progressivo della sieroprevalenza causato dalla maggior presenza numerica di *P. perniciosus*. (Martín-Sánchez *et al.* 2009).

Considerando che la diffusione del parassita è direttamente collegata all'attività del vettore, si potrebbe pensare che i mutamenti climatici possano avere indirettamente una ricaduta anche sulla possibile diffusione di altre specie di *Leishmania*.

Dujardin *et al.* (2008) considerano come potenziale l'ingresso in Europa, finora interessata solo dalla presenza di *L. infantum*, di *L. tropica*, agente della forma cutanea in Africa, medio Oriente e Sud-Est Asiatico, e di *L. donovani*, causa della forma viscerale nell'Africa dell'Est e nel subcontinente asiatico. Gli Autori hanno formulato la loro ipotesi sul fatto che in Europa sono presenti specie di flebotomi vettori potenziali di *L. tropica* e di *L. donovani*; quest'ultima ad esempio potrebbe usufruire della presenza di *P. sergenti*, la cui presenza è testimoniata in diversi Paesi dell'Europa meridionale.

Un contributo alla maggiore diffusione della LCan è stato dato anche dall'uomo. Negli anni si è andato profondamente modificando il rapporto dell'uomo con il cane, che convive strettamente con il suo padrone e lo segue nei sempre più frequenti suoi spostamenti, spesso in aree endemiche per LCan. Ciò ha contribuito all'introduzione dell'infezione in aree indenni. Il quadro è stato aggravato anche dal fatto che i proprietari che vivevano in aree dove la malattia non era presente, avevano una scarsa conoscenza della stessa. Ciò comportava che gli animali venivano esposti all'infezione senza alcuna protezione. Inoltre, l'avvenuto contatto con il parassita non veniva evidenziato in tempi brevi, dal momento che la manifestazione clinica della malattia intercorre solo dopo molto tempo e non interessa tutti gli animali infetti.

Va tenuto in considerazione che, da un punto di vista epidemiologico, gli animali infetti asintomatici giocano un ruolo importante nella diffusione della malattia in quanto sono in grado di trasmettere il patogeno al flebotomo (Oliva *et al.*, 2006). Anche il trasferimento di cani infetti da canili delle aree endemiche a quelli delle zone indenni è un aspetto che deve essere tenuto nella giusta considerazione. Tutti questi fattori, dipendenti o meno dall'uomo, hanno avuto complessivamente un ruolo nel cambiamento dell'areale di distribuzione della LCan.

SISTEMI DI ANALISI EPIDEMIOLOGICA: *GEOGRAPHIC INFORMATION SYSTEMS (GIS)*

I cambiamenti ambientali, climatici e sociali hanno contribuito fortemente all'espansione della leishmaniosi, come già esposto.

Se da un lato non è possibile, o comunque molto difficile, impedire che questi cambiamenti si verifichino, d'altro canto si può tentare di monitorarne l'andamento, allo scopo di istituire una rete di sorveglianza che permetta di pianificare interventi tempestivi laddove necessario.

A tal proposito è importante avere a disposizione strumenti che permettano di fare una valutazione oggettiva del rischio di diffusione/introduzione dell'infezione in dati territori, e che al contempo siano facilmente interpretabili.

In quest'ottica, le mappe geografiche sono da sempre state un valido supporto per lo studio dell'epidemiologia delle malattie. Esempio storico è quello del lavoro fatto da Snow nel 1853/1854 quando a Londra identificò, mediante la mappatura dei casi di colera verificatisi, una fontana da cui partiva il sistema di tubazioni che distribuiva l'acqua contaminata. Lo studio di Snow può essere considerato pionieristico nell'impiego delle mappe geografiche in studi epidemiologici.

Il concetto di carta geografica in senso tradizionale è stato rivoluzionato con l'introduzione dei *Geographic Information Systems* (GIS), o Sistemi Informativi Geografici, che nacquero per essere applicati alle Scienze della Terra e alle Scienze Sociali, e si sono rivelati strumenti innovativi e importanti anche negli ambiti più svariati, tra i quali quello medico-veterinario.

COSA È IL GIS?

Un GIS è un sistema computer-assistito che permette l'acquisizione, la memorizzazione e l'analisi di informazioni di qualsiasi tipo per la creazione di mappe.

L'espressione *Geographic Information System* venne coniata negli anni '60 in Canada da Roger Tomlinson per indicare un sistema di archivio computerizzato, studiato per la processazione e l'analisi di dati concernenti le risorse naturali presenti sul territorio nazionale quale supporto per l'attuazione di decisioni operative.

Contemporaneamente, l'espressione GIS venne adottata anche per indicare strumenti e procedure per l'archiviazione e l'elaborazione di dati di varia natura riferiti ad una realtà geografica.

La letteratura specialistica fornisce un ampio ventaglio di definizioni dell'espressione GIS, volte a descrivere i molteplici aspetti funzionali, costitutivi ed applicativi del sistema (Ozemoy, 1981; Burrough, 1986; DoE, 1987; Cowen, 1988; Parker, 1988; Aronoff, 1989; Peverieri, 1995).

Le varie definizioni riassumono alcuni degli aspetti focali dei GIS:

- ~ possibilità di analizzare dati di varia natura;
- ~ opportunità di riferire l'informazione ad entità territoriali e quindi di correlare il dato ad una collocazione spaziale;
- ~ possibilità di mettere in relazione i dati e la loro elaborazione con specifici interrogativi (Parente e Santamaria, 2004).

Un sistema GIS si compone essenzialmente di tre parti: un *hardware*, un *software* e una banca dati.

L'*hardware* è composto dall'insieme di computer con il quale opera il GIS. Il *software* è costituito da funzioni e strumenti che permettono la raccolta, l'analisi e la visualizzazione delle informazioni geografiche. In commercio sono disponibili diversi programmi, alcuni dei quali distribuiti gratuitamente. Al di là della scelta, il software deve soddisfare alcune caratteristiche quali ad esempio la velocità di analisi, l'affidabilità dell'elaborazione, interfacciamento con altri programmi.

Fondamentale per la creazione di un sistema GIS è la realizzazione di una banca dati, mediante la quale vengono organizzate le informazioni.

I dati si distinguono in dati geografici e attributi tabellari.

I dati geografici riguardano la configurazione dei luoghi e permettono di realizzare un modello rappresentativo della realtà. Tali dati possono essere rappresentati secondo formati diversi, tra i quali si ricorda quello vettoriale e

quello raster. Il primo definisce le posizioni e le caratteristiche di oggetti rappresentati da punti, linee, superfici, mentre il secondo definisce le posizioni e le caratteristiche di elementi, sotto forma di pixel, di dimensioni regolari che rappresentano porzioni discrete di territorio (Rinaldi *et al.*, 2004). Quello vettoriale è il formato che meglio si presta a descrivere le entità geografiche e consente ampie possibilità di elaborazione dei dati, non solo geometrici, consentendo di fare associazioni anche complesse tra loro e gli attributi tabellari.

Gli attributi tabellari sono costituiti da dati alfanumerici che vengono associati agli elementi geografici.

Le informazioni analizzate mediante il sistema GIS sono organizzate su strati (o piani) sovrapponibili, ciascuno dei quali contiene dati di diversa natura, che possono essere attivati, disattivati o integrati fra loro al fine di avere graficamente diverse tipologie di informazioni su aspetti differenti.

L'aspetto importante è che gli attributi tabellari interagiscono con le informazioni geografiche presenti in ciascuno strato e anche con gli elementi che hanno una collocazione corrispondente in altri strati, che a loro volta contengono altri dati (Brianti, comunicazione personale).

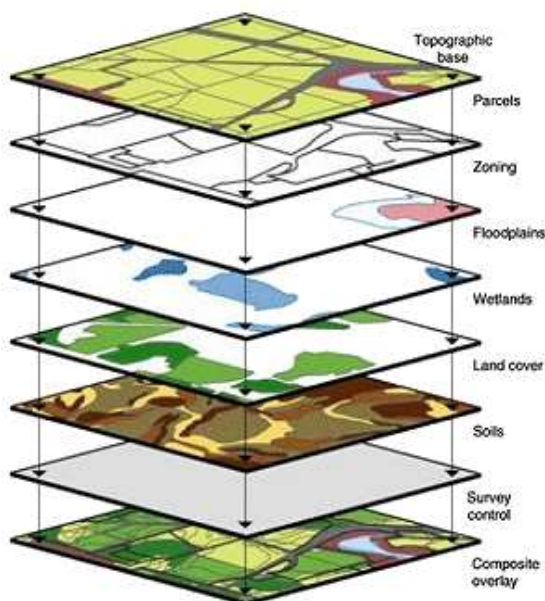


Figura 8: Schematizzazione dei piani sovrapposti in un sistema GIS (www.co.cal.md.us)

UTILIZZO DEL GIS IN MEDICINA VETERINARIA

Le grandi potenzialità applicative dei sistemi GIS giustificano l'impiego sempre più diffuso che se ne fa in ambito veterinario.

Il principale uso è di tipo descrittivo: tramite queste tecnologie è possibile ottenere delle mappe che diano informazioni riguardanti ad esempio la densità della popolazione animale in un dato territorio, la presenza di allevamenti di un dato tipo ecc., come nel lavoro svolto da Cringoli *et al.* (2001) in riferimento alla distribuzione dei paramfistomi negli ovini dell'Appennino Meridionale.

Oltre all'applicazione di tipo descrittivo i sistemi GIS si prestano molto bene anche per applicazioni di tipo analitico e predittivo, aspetto che viene messo in evidenza soprattutto nelle attività di sorveglianza e monitoraggio delle malattie e nella pianificazione degli interventi di emergenza. I sistemi GIS permettono infatti di analizzare l'influenza dei fattori ambientali nella diffusione di una malattia, consentendo così di fare degli studi predittivi; possono anche essere impiegati in affiancamento alle convenzionali tecniche di monitoraggio, proponendosi come un utile mezzo per comprendere meglio le relazioni tra le diverse componenti epidemiologiche (Yilma e Malone, 1998).

Proprio in considerazione delle potenzialità dei GIS di valutare l'influenza dei fattori ambientali nella diffusione delle malattie, nel 2000 venne istituito un *global network* che coinvolgeva studiosi di diversa estrazione con lo scopo di sviluppare un sistema informatico, basato sulle tecnologie GIS, da utilizzare nel controllo di *snail-borne disease* di interesse medico e veterinario. Si stabilì la messa a punto di un "*Minimun medical database*" (MMDb) costituito da mappe e informazioni riguardanti fattori geografici, ecologici ed ambientali di una data zona, integrati con dati epidemiologici georeferenziati riferibili ad una data malattia (Malone *et al.*, 2001; Brianti *et al.*, 2004). A partire da questo progetto iniziale sono stati istituiti quattro MMDb riferiti alle aree dell'Africa Orientale ed Occidentale, dell'Asia e del Sud America che sono impiegati per il controllo delle zoonosi trasmesse da vettori. Un progetto analogo è stato messo in piedi anche per l'Europa, inserendo dati riferibili alla vegetazione, alla temperatura e

alla elevazione al suolo; a questi si sono sommati dati epidemiologici per le malattie parassitarie che interessano il Continente (Brianti *et al.*, 2004).

La bibliografia dà vari esempi dell'utilizzo delle tecnologie GIS in campo veterinario.

Un esempio è fornito dal lavoro di Mott *et al.* (1995) nel quale vengono analizzati gli aspetti geografici e intersettoriali dell'epidemiologia e del controllo di alcune zoonosi parassitarie quali la tripanosomiasi africana, la malattia di Chagas, la schistosomiasi, la leishmaniosi e le infezioni da trematodi di origine alimentari.

Un sistema GIS è stato impiegato per correlare la distribuzione degli allevamenti di api nelle Marche con la prevalenza della Peste Americana nella regione (Cardoni e Spagnulo, 2006).

In Toscana la tecnologia GIS ha permesso di effettuare uno studio delle parassitosi intestinali negli allevamenti bovini, includendo nell'analisi una serie di fattori ambientali potenzialmente influenzanti la diffusione dei parassiti (Perrucci *et al.*, 2006).

Albieri *et al.* (2006) hanno sfruttato il sistema informatico per effettuare un'analisi della distribuzione spaziali di *Aedes caspius* e *Aedes albopictus* nell'area urbana di Milano, allo scopo di ottenere una mappa della densità di distribuzione delle due specie e poter strutturare un sistema di sorveglianza.

Ancora, si ricorda il lavoro di Aloï *et al.* (2006) che hanno impiegato un sistema GIS per la sorveglianza della Peste suina africana in Sardegna.

Lavori di questo genere sono stati svolti per svariate malattie come ad esempio la malaria, la Rift Valley Fever, la filariosi, la fasciolosi e la schistosomosi (Yilma e Malone, 1998).

Non mancano naturalmente esempi dell'applicazione di questa tecnologia per lo studio della leishmaniosi.

Bavia *et al.* (2005) utilizzando il GIS, hanno valutato i fattori determinanti la diffusione della leishmaniosi viscerale in un'area del nord del Brasile fino ad allora indenne dalla malattia. È stato così messa in luce l'importanza di un fattore ambientale: sembrerebbe che la mancanza di una vegetazione verde e florida nell'area favorisca la presenza e la diffusione dei flebotomi. È infatti stato

notato che al crescere del *Normalized Difference Vegetation Index* (NDVI), indice di vegetazione attiva, diminuisce il numero di flebotomi.

La tecnologia GIS è stata impiegata in uno studio condotto da Sudhakar *et al.*, (2006), al fine di studiare la relazione esistente tra il macro-ecosistema della zona e la distribuzione del vettore *P. argentipe* ed ottenere una mappatura delle aree tendenzialmente a rischio per la diffusione della leishmaniosi viscerale in India.

In riferimento alla situazione italiana si ricordano i lavori di Brianti *et al.* (2007) e di Poglayen *et al.* (2008).

Brianti *et al.* (2007) hanno applicato il sistema GIS per la realizzazione di un *Health Information System* (HIS) per la sorveglianza della leishmaniosi nell'area urbana della città di Messina.

Il modello proposto dagli Autori ha consentito di effettuare delle analisi diversificate: ottenere il numero totale di casi di leishmaniosi verificatisi nell'area in esame e la loro georeferenziazione; acquisire l'esatta densità dei casi e loro distribuzione spaziale; verificare l'eventuale relazione tra i casi di leishmaniosi umana e quelli verificatisi nella popolazione canina; calcolare il numero di cani infetti che potrebbero costituire una fonte di trasmissione per l'uomo in una data area.

Poglayen *et al.*, (2008) hanno applicato il sistema ad uno studio retrospettivo sui casi di leishmaniosi canina verificatisi in zone collinari e pedecollinari di un'area orientale della regione Emilia-Romagna tra le province di Bologna e Ravenna. I dati ottenuti, riferiti ai casi osservati tra il 1995 e il 2007, hanno permesso di individuare un importante cluster nell'area interessata in passato da uno storico focolaio di LVZ (Pampiglione *et al.*, 1974).

PROGETTO PER LA REALIZZAZIONE DI UN SISTEMA DI SORVEGLIANZA DELLA LEISHMANIOSI IN EMILIA- ROMAGNA

In considerazione ed in conseguenza dell'aumento degli episodi e degli allarmi connessi alle malattie trasmesse da vettori sia in campo veterinario che medico, nel 2007, per iniziativa del Servizio di Sanità Pubblica e del Servizio Veterinario della Regione Emilia-Romagna, viene promosso un progetto per la realizzazione di un sistema di sorveglianza delle malattie trasmesse da insetti vettori in grado di rispondere adeguatamente a problematiche emergenti e a patologie già presenti, con particolare attenzione alle malattie da *arbovirus*, nel primo caso, e alla leishmaniosi, nel secondo.

Il progetto, di durata triennale, si avvale della collaborazione di diverse unità operative:

- ❖ Il Laboratorio di Prova di Sierologia del Servizio di Prova MIPAV del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale (DSPVPA) dell'Università di Bologna;
- ❖ Il Centro Emiliano Romagnolo di Epidemiologia Veterinaria (CEREV);
- ❖ L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Emilia-Romagna - Sezioni di Bologna e di Reggio Emilia;
- ❖ Il Centro Agricoltura e Ambiente "G. Nicoli" di Crevalcore;
- ❖ L'Area Dipartimentale di Sanità Pubblica Veterinaria – AUSL di Ravenna;
- ❖ Il Dipartimento di Sanità Pubblica – AUSL di Cesena.

Parte sostanziale del progetto è rappresentata dalla sorveglianza della leishmaniosi, problematica riemergente sia in sanità pubblica sia in sanità animale.

Nell'ultimo decennio si è infatti registrata un'ampia diffusione dell'infezione nel serbatoio canino e, parallelamente, si sono verificati casi umani autoctoni con sempre maggiore frequenza.

Le azioni da intraprendere per la realizzazione della parte di progetto inerente la leishmaniosi sono state suddivise in 3 anni secondo il calendario sotto riportato.

I ANNO:

- Raccolta dei dati bibliografici relativi alla situazione epidemiologica della Regione Emilia-Romagna.
- Raccolta e analisi retrospettiva dei dati a partire dall'anno 2000, relativamente a LCan, flebotomi vettori, LVZ e LCS.
- Georeferenziazione dei dati raccolti.
- Sistema di sorveglianza nei canili mediante la loro georeferenziazione e l'attivazione di un programma di monitoraggio sierologico ed entomologico.
- Sorveglianza della malattia nell'uomo.
- Formazione ed educazione sanitaria nei confronti di operatori sanitari del Sistema Sanitario Nazionale e dei Veterinari Liberi Professionisti (VV.LL.PP.).

II ANNO:

Nel secondo anno vengono mantenute le azioni del primo anno e, in particolare, prosegue la raccolta dei casi di LCan in cani di proprietà, viene completato il monitoraggio nei canili regionali e attuata una sorveglianza permanente in quelli già monitorati, prosegue la sorveglianza della malattia nell'uomo e vengono intensificate le attività formative e di educazione sanitaria.

III ANNO:

Durante il terzo anno sono state portate avanti le azioni intraprese durante i primi due anni di attività e ne sono state programmate delle altre:

- Sorveglianza passiva sui cani di proprietà, mediante la collaborazione dei VV.LL.PP. e delle strutture diagnostiche e cliniche delle Facoltà di Medicina Veterinaria della regione.
- Attuazione di un piano di controllo veterinario a seguito di notifica di casi umani autoctoni.

- Intensificazione degli incontri e delle giornate di formazione con i VV.LL.PP.e con gli operatori di sanità pubblica, allo scopo di coinvolgere queste figure professionali nella realizzazione dei due punti precedenti.

Questo progetto si è ampiamente avvalso della competenza e della lunga esperienza, in materia di epidemiologia, diagnosi e controllo della leishmaniosi, dell'unità operativa facente capo al DSPVPA dell'Università di Bologna.

Tale unità operativa ha operato sia nel coordinamento del progetto sia in una serie di attività ad essa affidate, svolte anche in collaborazione con le altre unità operative.

Tra le attività di stratta competenza dell'unità operativa del DSPVPA dell'Università di Bologna erano contemplate le seguenti azioni:

- I. Coordinamento e valutazione di prove interlaboratorio, ai fini della validazione dei risultati ottenuti in IFI, metodica utilizzata per il monitoraggio sierologico.
- II. Approfondimenti diagnostici in casi risultati dubbi al controllo sierologico mediante successivi controlli sierologici e/o metodiche diagnostiche dirette sia tradizionali sia biomolecolari.
- III. Realizzazione di una banca dati dei casi di LCan in cani di proprietà, osservati a partire dal 2000.
- IV. Georeferenziazione dei dati di cui al punto 4, ai fini della valutazione della situazione epidemiologica in regione.

Le attività menzionate ai punti III e IV costituiscono oggetto della parte sperimentale della presente tesi.

PREMESSA ALLE PARTI SPERIMENTALI

Il contributo personale alla presente tesi può essere suddiviso in 2 parti.

La prima parte riguarda lo svolgimento delle azioni affidate all'unità operativa facente capo al Laboratorio di Prova di Sierologia del DSPVPA dell'Università di Bologna nell'ambito del progetto per la sorveglianza della leishmaniosi. In particolare verrà valutata la situazione epidemiologica dell'Emilia-Romagna tramite l'analisi delle mappe di georeferenziazione costruite sulla base dei dati raccolti relativamente ai casi di LCan in cani di proprietà.

La seconda parte della tesi è stata svolta in collaborazione tra il Laboratorio di Prova di Sierologia del DSPVPA dell'Università di Bologna e il Laboratorio di Parassitologia della Facoltà di Farmacia dell'Università di Barcellona e riguarda più precisamente l'aspetto diagnostico della malattia. Nello specifico, sono state confrontate diverse tecniche sierologiche applicate di routine nei due laboratori al fine di valutare la loro applicazione a scopi diagnostici epidemiologici.

PARTE SPERIMENTALE

**REALIZZAZIONE DI UNA BANCA DATI DEI
CASI DI L_{CAN} IN CANI DI PROPRIETÀ E
LORO GEOREFERENZIAZIONE**

PREMESSA

In virtù della lunga esperienza che il Laboratorio di Prova di Sierologia ha maturato in anni di studio sull'epidemiologia e il controllo della leishmaniosi canina, sono state affidate all'unità operativa facente capo a suddetta struttura le attività riguardanti la messa a punto e la realizzazione di una banca dati che raccogliesse tutte le informazioni reperibili riconducibili a casi di LCan in cani di proprietà verificatisi nel territorio regionale dal 2000 al 2008.

Con la realizzazione del database di cui sopra, ci si prefiggeva il raggiungimento di un duplice obiettivo: da una parte avere una stima, il più possibile vicina alla realtà, dei casi di LCan osservati tra i cani di proprietà, dall'altro realizzare delle mappe di georeferenziazione che permettessero di avere una visione d'insieme della situazione epidemiologica nella regione Emilia-Romagna, allo scopo di valutare fattori di rischio che possano contribuire alla diffusione della malattia, e di promuovere quindi eventuali azioni correttive.

MATERIALE E METODI

ANALISI DESCRITTIVA DEI DATI

Per la realizzazione della banca dati dei casi di LCan verificatisi in cani di proprietà sono state raccolte tutte le informazioni reperibili a partire dal 2000, e riferibili a diagnosi di LCan in animali residenti nelle varie province regionali.

Considerando che la provincia di Pesaro-Urbino e la Repubblica di San Marino hanno caratteristiche territoriali del tutto simili a quelle della regione Emilia-Romagna e data anche la vicinanza territoriale con zone a rischio della regione, dati provenienti da queste due aree sono state incluse nella banca dati.

Le informazioni raccolte nella banca dati provenivano dai dati a disposizione del Laboratorio di Prova di Sierologia e dei Servizi Veterinari delle Aziende Sanitarie Locali (AA.SS.LL.) regionali.

I dati provenienti dal Laboratorio di Prova di Sierologia derivavano da indagini siero-epidemiologiche condotte *ad hoc* e da conferme diagnostiche su casi sospetti.

I Servizi Veterinari delle AA.SS.LL. hanno fornito dati derivanti da segnalazioni di VV. LL. PP. operanti sul territorio regionale.

COMPILAZIONE DELLA BANCA DATI

Per ciascuna segnalazione inserita nella banca dati, si è cercato di reperire il maggior numero di informazioni, in modo da poter avere un quadro il più completo possibile.

I dati ritenuti importanti per il raggiungimento dello scopo prefissato al momento di intraprendere questa attività sono quelli elencati qui di seguito:

- ~ Identificativo del cane: in corrispondenza di questa voce si riportava il microchip o il tatuaggio del cane; in mancanza di questo dato, si indicava il nome del cane e/o il nominativo del suo padrone.

- ~ Sesso, razza, età: questa tipologia di dati sono stati raccolti per stimare se ci potesse essere una certa correlazione tra il sesso, la razza e l'età del cane e lo stato d'infezione.
- ~ Residenza del cane: si annotava l'indirizzo completo. La corretta registrazione di queste informazioni sarebbe poi stato di basilare importanza per la successiva georeferenziazione dei dati.
- ~ Veterinario curante.
- ~ Anno di segnalazione del caso.
- ~ Titolo IFI: qualora la diagnosi fosse stata fatta testando il soggetto in esame in IFI, si è riportato il titolo anticorpale osservato.
- ~ Altri esami utilizzati per la diagnosi, in alternativa all'IFI.
- ~ Segni clinici riferibili a leishmaniosi, se presenti al momento della diagnosi.
- ~ Origine dell'infezione: in base alle informazioni fornite dai proprietari al momento della diagnosi si cercava di stabilire per il cane, qualora fosse risultato positivo, l'origine dell'infezione. Si annotava autoctono (A) o non autoctono (NA), se il cane era rimasto sempre nel luogo di residenza o se aveva subito degli spostamenti, rispettivamente.

In merito al criterio di compilazione della banca dati vanno fatte alcune precisazioni.

Facendo riferimento all'IFI, tecnica *gold standard* per la diagnosi di LCan, sono stati inseriti solo cani che hanno dato esito positivo con titolo ≥ 40 .

Durante la fase di raccolta dei dati si è riscontrato che per alcuni soggetti sono stati ripetuti più volte nell'arco degli anni accertamenti diagnostici. In merito a questo aspetto è stato deciso che ciascun cane sarebbe stato inserito nella banca dati una sola volta, in quanto, se fossero state considerate tutte le segnalazioni come singoli casi si sarebbe avuta una sovrastima delle positività.

Per alcune segnalazioni è stato possibile solo reperire la positività per leishmaniosi, ma non la tecnica diagnostica impiegata per l'accertamento della positività.

ANNO	NOME	PR	COMUNE	INDIRIZZO	VETERINARIO	TITOLO IFI	ALTRI ESAMI	DIAGNOSI	ORIGINE DI INFEZIONE	SESSO	RAZZA	ETÀ	SINTOMI 1/0
2004	SPEEDY	MO	FIORANO MODENESE			40		IFI	NA	M	METICCIO	11	0
2004	LUCKY	MO	FIORANO MODENESE			80		IFI	NA	M	YORKY	4	1
2003	DICK	MO	MARANELLO			640	COLTURA	IFI	A	M	PASTORE BELGA	5	0
2003	CHICCO	MO	MARANELLO			320	COLTURA	IFI	A	M	METICCIO	8	0
2003	LESSIE	MO	MARANELLO			5120	COLTURA	IFI-PCR-ISOL	A	M	METICCIO	2	0
2001	MAZZOLA	MO	MODENA			>640		IFI	A	M	PASTORE TEDESCO	3	1
2002	380098101157 986	MO	MODENA			320		IFI	A	M	METICCIO	7	1
2004	MO02946	MO	MODENA			2560		IFI	ND	/	/	/	
2002	UGO	MO	MODENA			>640		IFI	NA	M	BOXER	6	1
2003	MAO	MO	PRIGNANO S. SECCHIA			2560		IFI	A	M	METICCIO	10	1
2004	CHARLY	MO	SASSUOLO			1280		IFI	ND	M	LABRADOR	1	1
2008	CLAY	MO	GUIGLIA				ELISA	ELISA	A	/	/	/	
2008	TAFFY	MO	GUIGLIA(ROCCA MALATINA))			40		IFI	A	M	MALTESE	5	0

Tabella 2: Struttura della banca dati. (I dati su indirizzo e veterinario curante sono stati omessi in ottemperanza alla legge sulla privacy)

ANALISI GEOGRAFICA E GEOSTATISTICA DEI DATI

I dati raccolti nella banca dati di cui sopra sono stati esaminati al fine di produrre mappe georeferenziate della situazione epidemiologica della regione.

L'elaborazione dei dati è stata effettuata in collaborazione con il Dott. Brianti, Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Messina.

Il progetto geografico, realizzato in ambiente ArcView GIS 3.3 (ESRI, Inc), includeva un *dataset* di temi (vettoriali e raster) della regione Emilia-Romagna (fonte ISTAT, sistema di coordinate UTM fuso 32). I casi di LCan sono stati georeferiti e inclusi nel progetto geografico con l'ausilio della funzione di *geocode address* sulla base dell'indirizzo di residenza del proprietario. Per coerenza geografica, dall'analisi spaziale sono stati esclusi i casi di LCan che ricadevano nei territori della provincia di Pesaro-Urbino e nella Repubblica di San Marino.

In fase descrittiva i casi di LCan sono stati rappresentati sia in formato puntuale su tutta l'area di studio sia aggregati per poligoni (provincia, comuni) in mappe di tipo cloropletico.

A causa dell'estensione del territorio di studio e dalla disomogeneità geografica e temporale di notifica dei casi, l'analisi geostatistica è stata condotta solo nelle province di Bologna e Rimini dove sia la copertura geografica sia la frequenza di notifica presentavano una maggiore omogeneità rispetto alle altre aree di studio. La densità dei casi di LCan per km² è stata investigata e analizzata attraverso la funzione di *kernel density* di ArcView GIS Spatial Analysis.

Inoltre, con lo scopo di correggere le eventuali differenze nella frequenza dei casi dovute esclusivamente alla diversa consistenza numerica delle popolazioni a rischio e valutare la reale forza d'infezione, i casi di LCan sono stati normalizzati sulla popolazione canina di proprietà censita nei singoli comuni e per ciascun poligono comunale è stato calcolato e analizzato il valore del Rapporto di Incidenza (Thrusfield, 1989; Moreira *et al.*, 2004; Otranto *et al.*, 2007).

RISULTATI

ANALISI DESCRITTIVA DEI DATI

L'allestimento della banca dati ha permesso di raccogliere informazioni relative ad un totale di 538 casi di LCan diagnosticati tra il 2000 e il 2008. Il minor numero di notifiche è stato registrato nell'anno 2002 (42), il maggior numero nell'anno 2007 (103); la media di casi notificati per anno è stata di 60 (Grafico n.1)

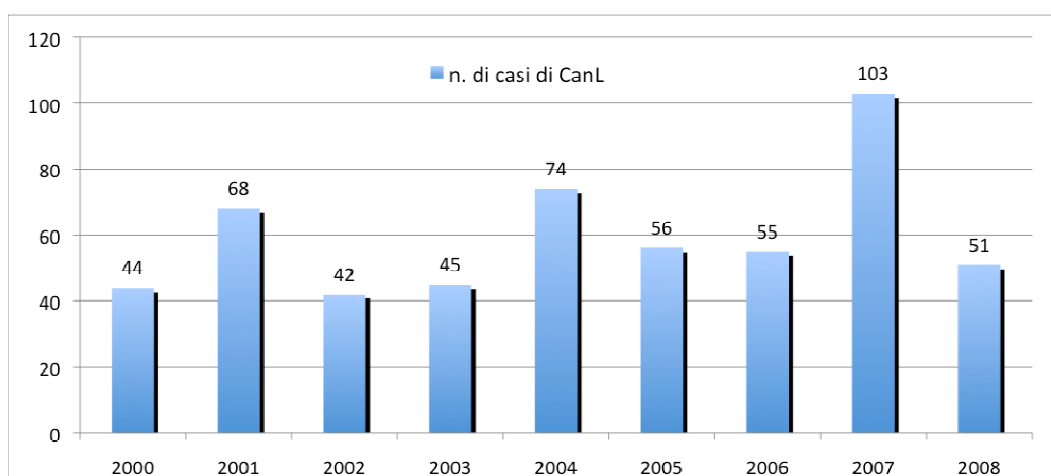


Grafico n.1: Numero di casi notificati per anno

Sebbene la presenza di casi di LCan sia stata notificata, almeno una volta, in tutte le province della regione, il maggior numero di segnalazioni proveniva dalle province di Bologna (235) e Rimini (204). In queste due province, è stata registrata anche una continuità annua di casi con valori medi di 26,1 e 22,7 casi/anno, rispettivamente per Bologna e Rimini. La tabella 3 riporta l'elenco dei comuni dove è stato notificato un numero >10 di casi di CanL nel periodo 2000-2008.

PROVINCIA	COMUNE	CASI CANL (2000-2008)
BO	Bologna	38
BO	Castel San Pietro Terme	29
BO	Imola	38
BO	Montevoglio	14
BO	Ozzano	18
RN	Misano	13
RN	Morciano di Romagna	20
RN	Riccione	16
RN	Rimini	13
RN	Saludecio	37
RN	San Giovanni in Marignano	29
RN	Santarcangelo di Romagna	15

Tabella 3: Comuni delle province di Bologna e Rimini con numero di casi >10

In merito alle altre province, la media è stata di 16 notifiche per provincia.

La maggior parte delle comunicazioni (54,6%, 294/538) è giunta da strutture private come ambulatori e cliniche veterinarie (notifiche esterne), la rimanente parte (45,4%, 244/538) è relativa all'attività diagnostica svolta dal Laboratorio di Sierologia (notifiche interne).

Conteggiando le comunicazioni per anno, è stato osservato un trend annuo in aumento per le notifiche esterne, mentre non è stato possibile giungere alla medesima conclusione in merito alle notifiche interne, per le quali non si è osservato nessun trend particolare (Tabella 4).

ANNO	NOTIFICHE INTERNE		NOTIFICHE ESTERNE	
	N	%	N	%
2000	37	15,2	7	2,4
2001	55	22,5	13	4,4
2002	24	9,8	18	6,1
2003	24	9,8	21	7,1
2004	43	17,6	31	10,5
2005	17	7,0	39	13,3
2006	13	5,3	42	14,3
2007	17	7,0	86	29,3
2008	14	5,7	37	12,6
TOTALE	244		294	

Tabella 4: Notifiche annue interne ed esterne

Relativamente alle metodiche utilizzate per la diagnosi, la maggior parte dei casi (459/538, 85,3%) è stata diagnosticata mediante l'uso di metodiche sierologiche (IFI 76,6% e ELISA 8,7%), inferiore l'uso di metodiche dirette quali la citologia (24/538) o la PCR (6/538). Per 49 dei 538 (9,1%) casi notificati non è stato possibile ottenere la metodica di diagnosi utilizzata (Tabella 5)

TIPO DI DIAGNOSI	NUMERO	%
IFI	412	76,6
ELISA	47	8,7
MICROSCOPICA	24	4,5
PCR	6	1,1
ND	49	9,1
TOTALE	538	100

Tabella 5: tipologie di analisi diagnostiche impiegate

In merito ai cani infetti, questi avevano un età media di 5,4 anni (± 3) ed erano per la maggior parte maschi, per la variabile sesso, e di razza pura per la variabile razza.

Lo stato sanitario è stato notificato solo per 189 dei 538 casi notificati; di questi 114 (60,3%) sono stati classificati come sintomatici e 75 (39,7) come asintomatici.

L'origine di infezione è stata accerta per 244 casi. In totale i casi classificati come "autoctoni" sono stati numericamente superiori (147), ai casi importati, rapporto 1,5:1; tuttavia, per ben 97 casi è stata ipotizzata un origine di infezione non-autoctona (Tabella 6).

ANNO	AUTOCTONI (%)	IMPORTATI (%)	ODDS RATIO
2000	25	11	1,00
2001	32	19	0,74
2002	16	7	1,01
2003	20	3	2,93
2004	21	21	0,44
2005	10	8	0,55
2006	4	12	0,15
2007	15	9	0,73
2008	4	7	0,25

Tabella 6: Casi autoctoni, importati e odds ratio

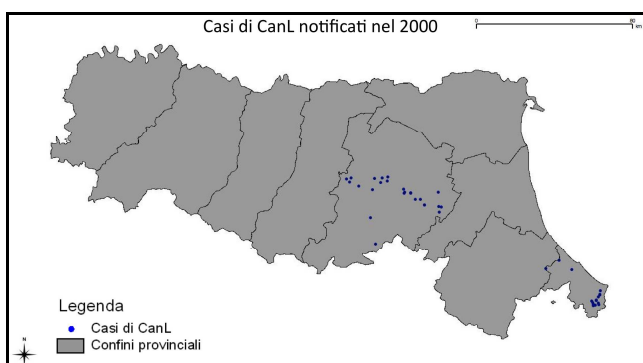
Relativamente ai soli casi diagnosticati mediante IFI, è stata effettuata una suddivisione in quattro classi sulla base del titolo anticorpale (40-80, 160-320, 640-1280 e >1280). Il maggior numero di casi (125) è risultato compreso nella seconda classe (160-320), mentre i rimanenti casi si sono ripartiti in modo pressoché uniforme nelle altre tre categorie. Relativamente alla associazione tra titolo anticorpale e status sanitario dei cani infetti è stato osservato un aumento significativo del rapporto sintomatici/asintomatici al crescere del titolo anticorpale (Tabella 7) ($\chi^2=20,764$; 3 gradi di libertà; $P=0,0001$).

CLASSI IFI	N	SINTOMATICI	ASINTOMATICI
40-80	84	19	30
160-320	125	23	22
640-1280	93	43	15
> 1280	91	29	8
ND	19	-	-

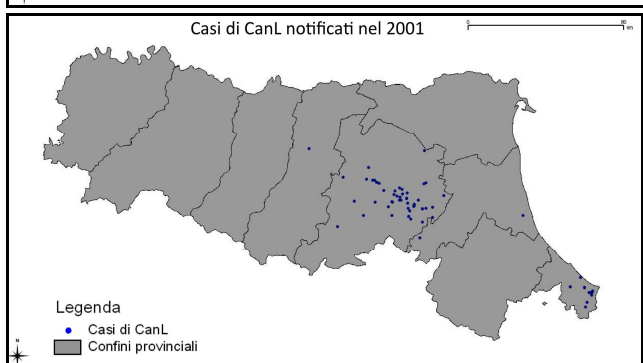
Tabella 7: Suddivisione dei casi in base al titolo anticorpale e allo stato sanitario

ANALISI GEOGRAFICA DEI RISULTATI

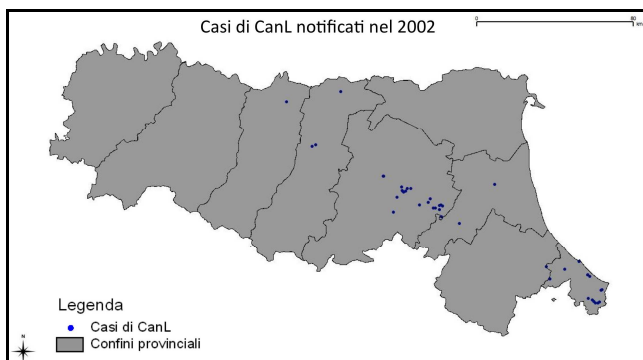
Per coerenza geografica, dall'analisi spaziale dei risultati sono stati esclusi i casi di CanL che ricadevano nel territorio della provincia di Pesaro-Urbino e della Repubblica di San Marino. La cronologia annua e la posizione geografica dei casi notificati in regione Emilia-Romagna sono rappresentati nelle Mappe 1-9, mentre nella Mappa n. 10 si ha la rappresentazione grafica del numero complessivo di casi notificati. I dati sono stati tabulati in Tabella 8



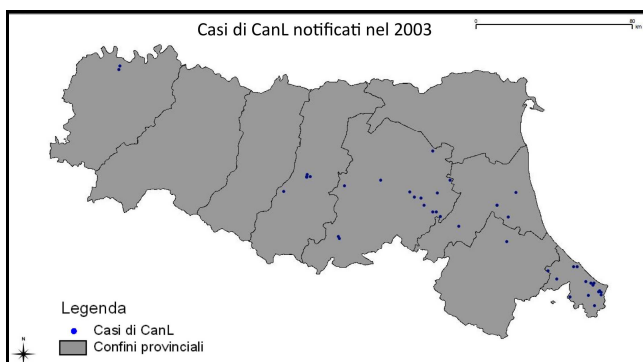
Mappa n.1: Casi di LCan nel 2000



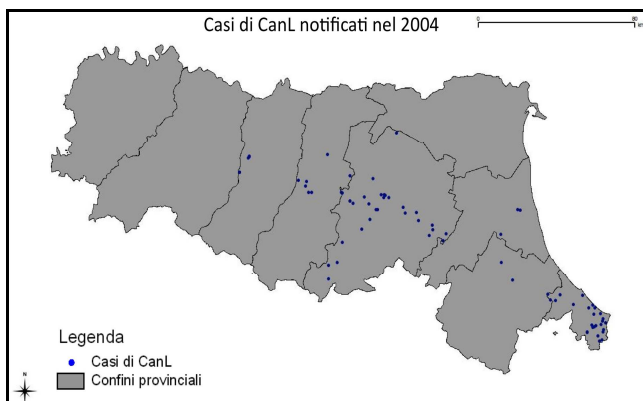
Mappa n.2: Casi di LCan nel 2001



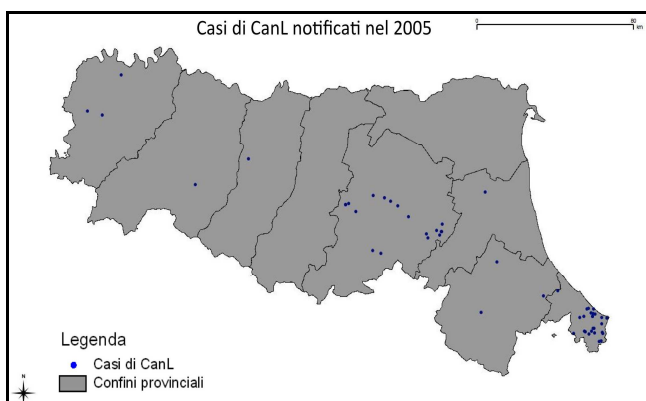
Mappa n.3: Casi di LCan nel 2002



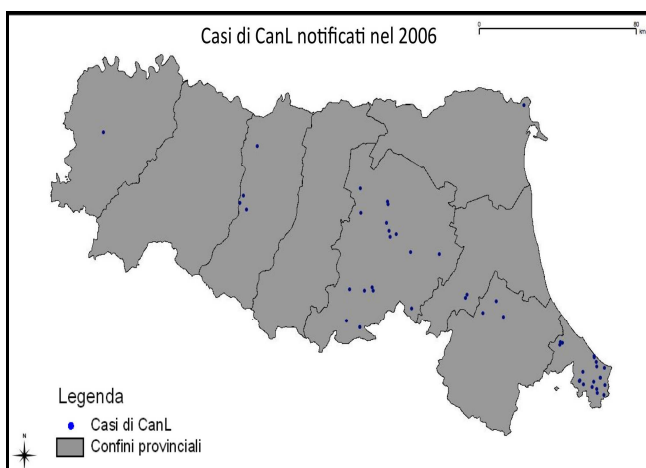
Mappa n. 4: Casi di LCan nel 2003



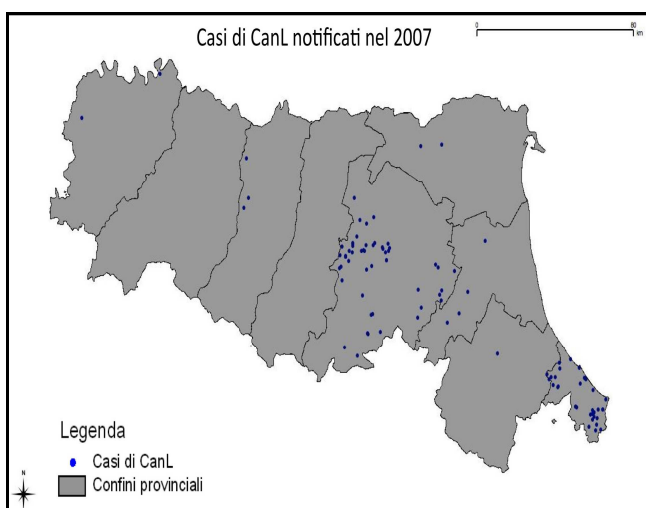
Mappa n. 5: Casi di LCan nel 2004



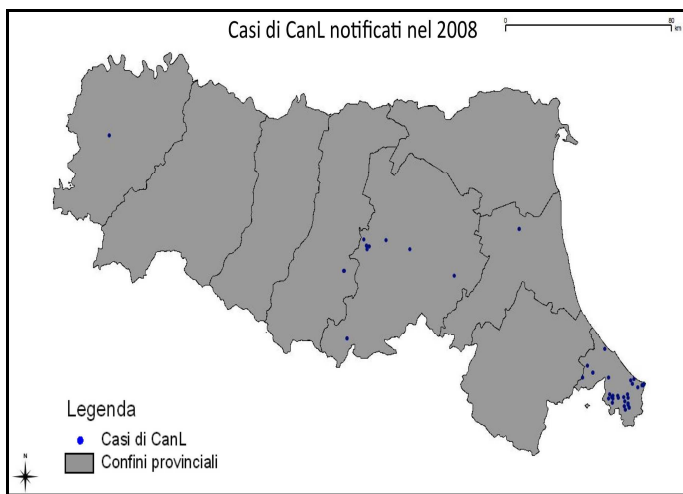
Mappa n. 6: Casi di LCan nel 2005



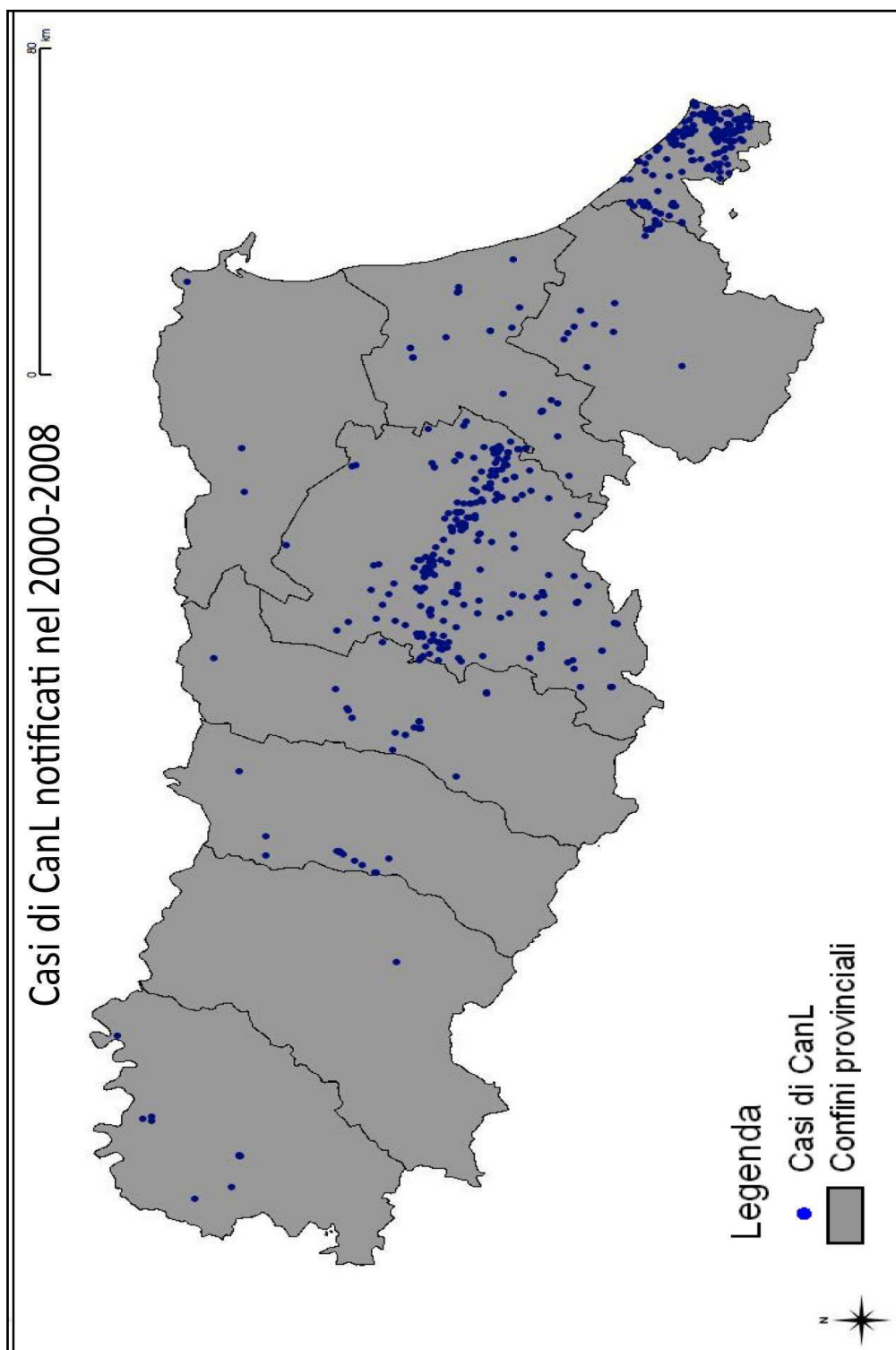
Mappa n. 7: Casi di LCan nel 2006



Mappa n. 8: Casi di LCan nel 2007



Mappa n. 9: Casi di LCan nel 2008

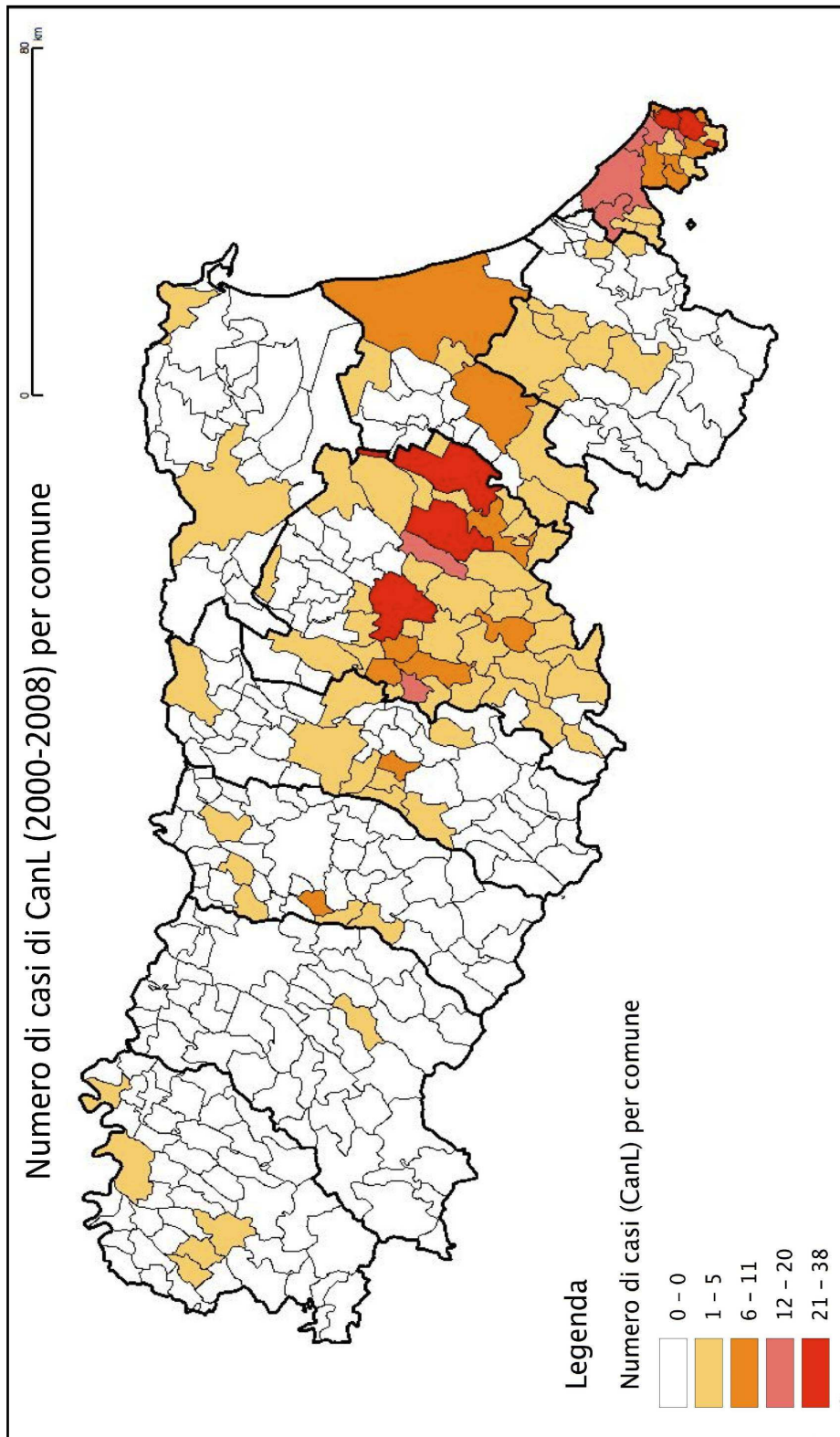


Mappa n. 10: Casi notificati dal 2000 al 2008

	PROVINCIA									
ANNO	BO	FC	FE	MO	PC	PR	RA	RE	RN	IMPORTO TOTALE
2000	25								19	44
2001	51			1			2		13	67
2002	21			3			2	1	15	42
2003	14	1		7	2		5		16	45
2004	32	2		6			3	5	26	74
2005	15	7			3	1		1	26	53
2006	17	5	1		1		2	4	21	51
2007	50	2	2		2		4	3	35	98
2008	10			3	1		2		33	49
TOTALE	235	17	3	20	9	1	20	14	204	523

Tabella 8: Notifiche per provincia e anno.

Nella Mappa n.11 è stato rappresentato il numero totale di casi notificati all'interno delle singole province (delimitate in nero) e nei vari Comuni (delimitati in grigio). È stata utilizzata una scala cromatica dal bianco al rosso per indicare il numero di casi: in bianco sono stati indicati i territori dai quali non è pervenuta alcuna notifica, con due gradazioni di arancione sono stati indicati i Comuni con numero totale di notifiche compreso tra 1 e 11, mentre con due tonalità di rosso sono stati rappresentati i comuni per i quali il numero di notifiche era compreso tra 12 e 38.



Mappa n. 11: Numero di casi di LCan notificati dal 2000 al 2008 in diversi comuni

L'altitudine geografica, per la totalità dei casi notificati, variava da 0 a 913 metri s.l.m. (media=139m \pm 148m); tuttavia, la maggior parte dei casi era concentrata nella fascia altimetrica compresa tra 15 e 293 metri (Grafico 2)

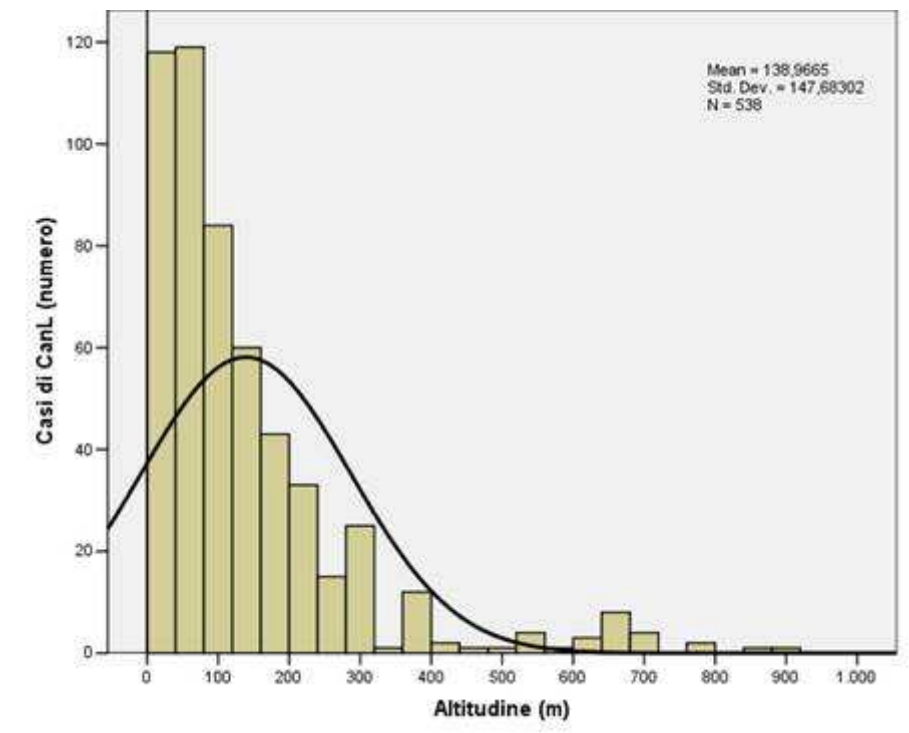
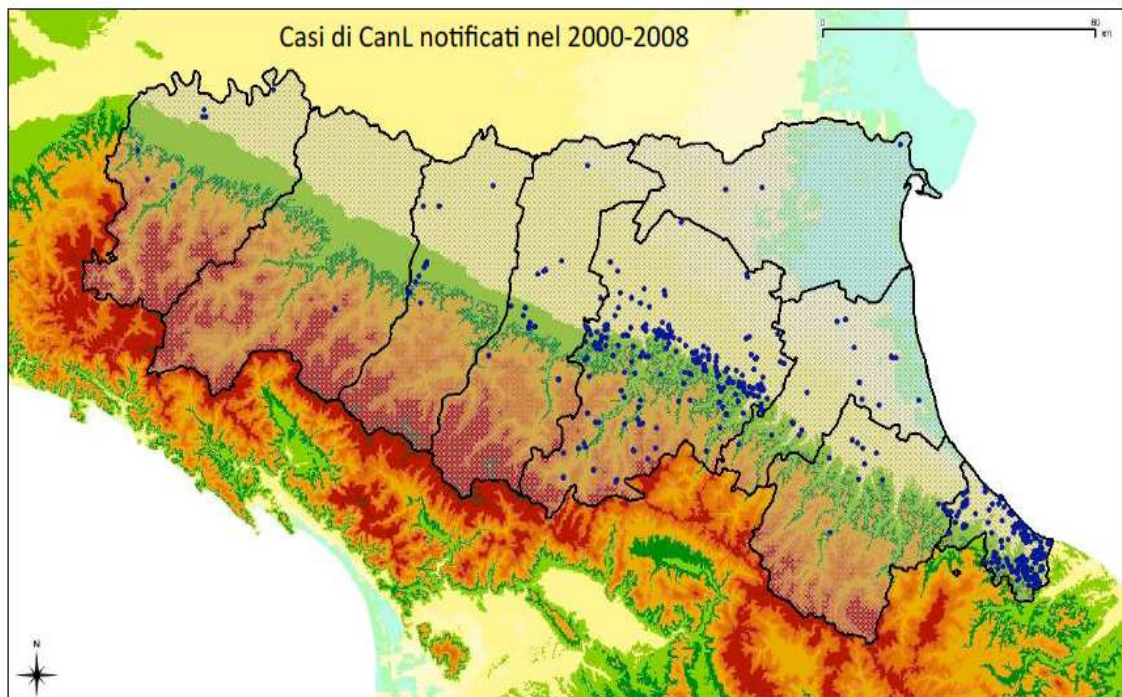


Grafico 2: Rappresentazione dei casi di LCan in relazione all'altitudine

Nella Mappa n.12 è rappresentato il numero totale di casi notificati e, alla rappresentazione poligonale dei comuni, è stata sovrapposta l'olografia territoriale, che evidenzia l'elevazione territoriale.

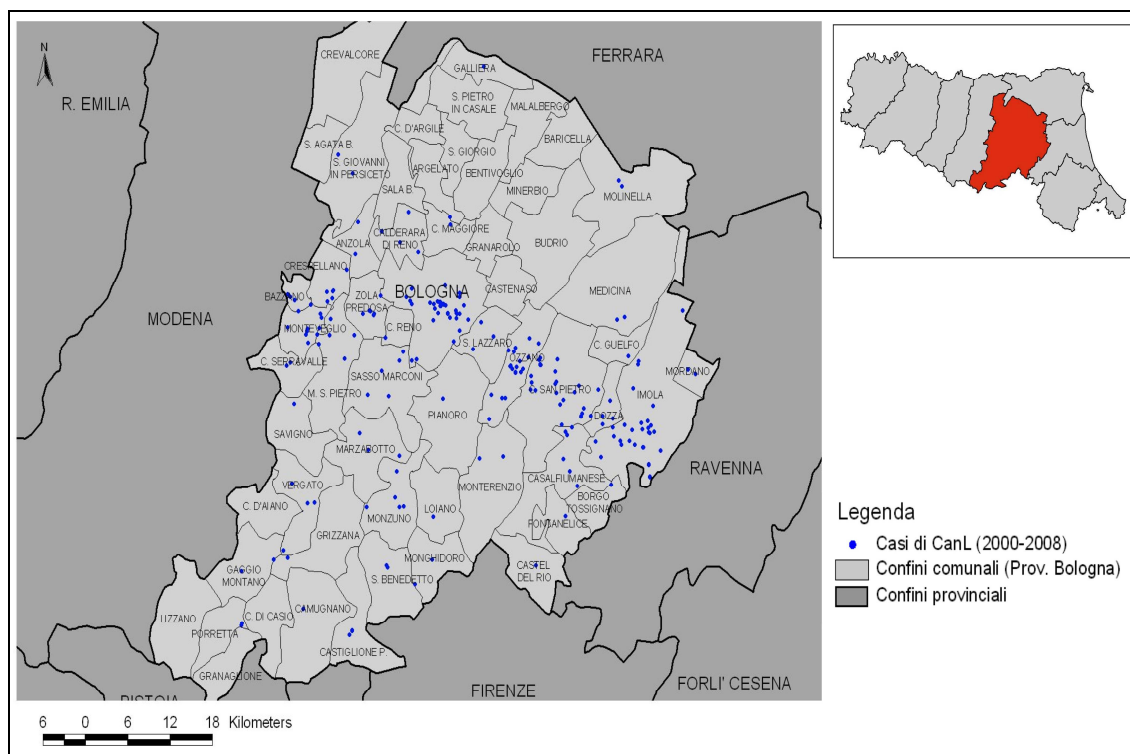


Mappa n.12: Numero di casi di LCan notificati dal 2000 al 2008 in associazione all'olografia territoriale

Al fine di ridurre la disomogeneità geografica e temporale di notifica dei casi, le ulteriori analisi spaziali dei risultati sono state condotte solo per le province di Bologna e Rimini dove sia la copertura geografica sia la frequenza di notifica hanno presentato una maggiore omogeneità rispetto alle altre province della regione.

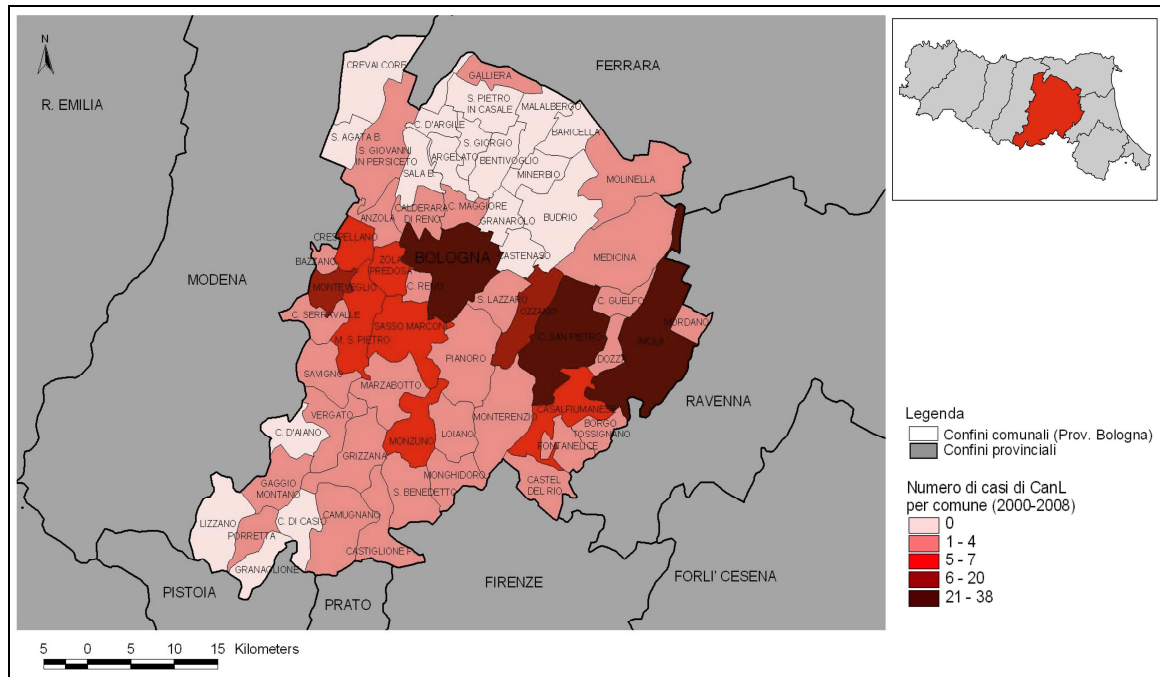
PROVINCIA DI BOLOGNA

Nella provincia di Bologna sono stati notificati un totale di 235 casi di LCan. Nella Mappa 13 sono indicate le posizioni geografiche dei singoli casi; in grigio chiaro sono delineati i confini dei comuni, in una tonalità più scura è delineato il confine della provincia di Bologna. I casi di Lcan notificati per questo territorio sono rappresentati dai punti blu.



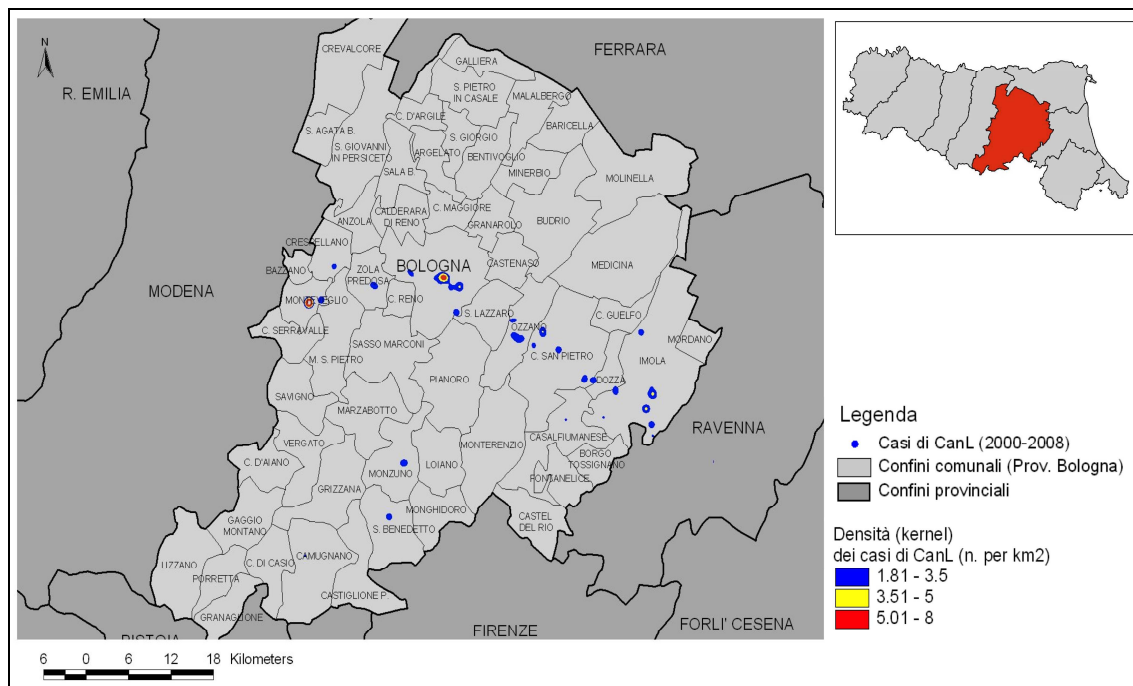
Mappa n.13: Casi di LCan notificati dal 2000 al 2008 nella provincia di Bologna

Nella Mappa n. 14 i singoli comuni della provincia sono rappresentati con colorazioni diverse in base al numero di casi notificati nel territorio.



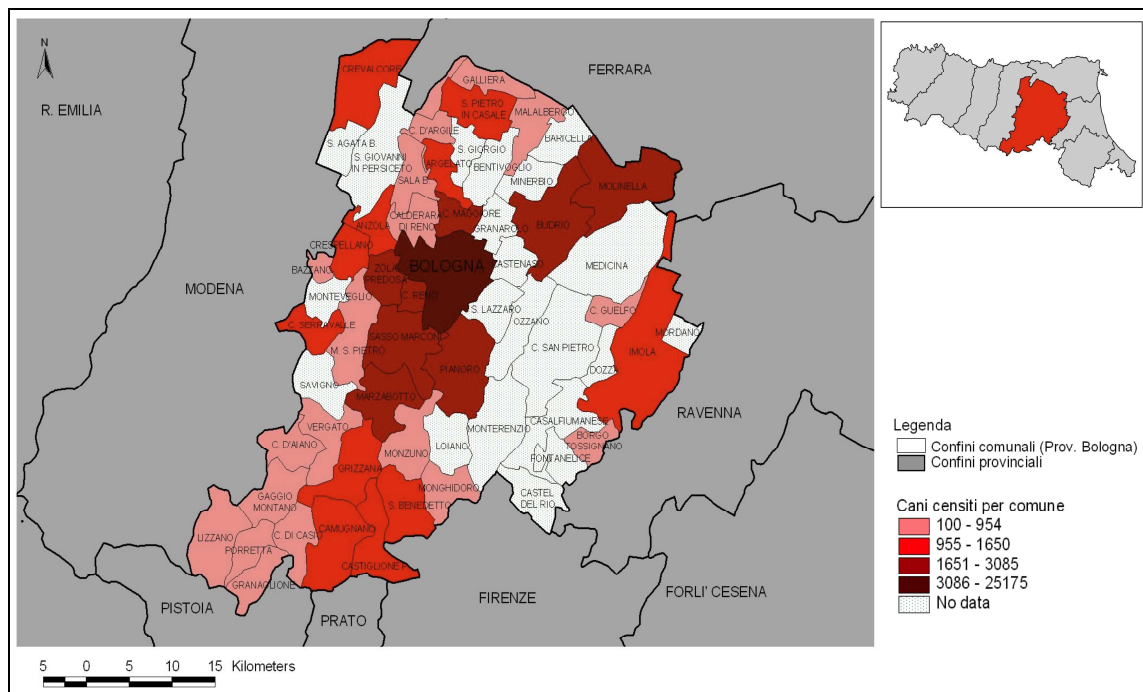
Mappa n.14: Rappresentazione dei Comuni della provincia di Bologna in relazione al numero di casi di LCan notificati nel territorio

Sebbene i casi siano stati notificati nella maggior parte dei comuni della provincia, con una densità media di 0,06 casi per km², una maggiore aggregazione spaziale è stata osservata in alcuni comuni che hanno raggiunto valori di densità di casi significativamente superiori ai territori circostanti (Mappe 15 e 16). I principali *clusters* di aggregazione sono stati evidenziati utilizzando colorazione diverse in base alla densità di casi positivi osservati: in blu sono state indicate le zone con densità fino a 3,5 cani infetti per Km², in giallo i territori con densità fino a 5 cani per Km² e in rosso le zone con densità fino a 8 cani per Km².



Mappa n. 15: Densità di casi di LCan nella provincia di Bologna

Al fine di valutare se la densità dei casi all'interno dei singoli comuni possa essere stata influenzata dalla numerosità della popolazione canina residente, è stato preso in considerazione, laddove disponibile, il dato derivante dall'anagrafe canina comunale. Nella Mappa n. 17, i vari poligoni corrispondenti ai comuni sono stati colorati con differenti tonalità di rosso in base al numero di animali iscritti all'anagrafe: dal rosa, indicante comuni con una popolazione canina registrata che arriva fino a 954 animali, al bordeaux, usato per i comuni in cui la popolazione canina arriva fino a più di 25000 soggetti registrati.

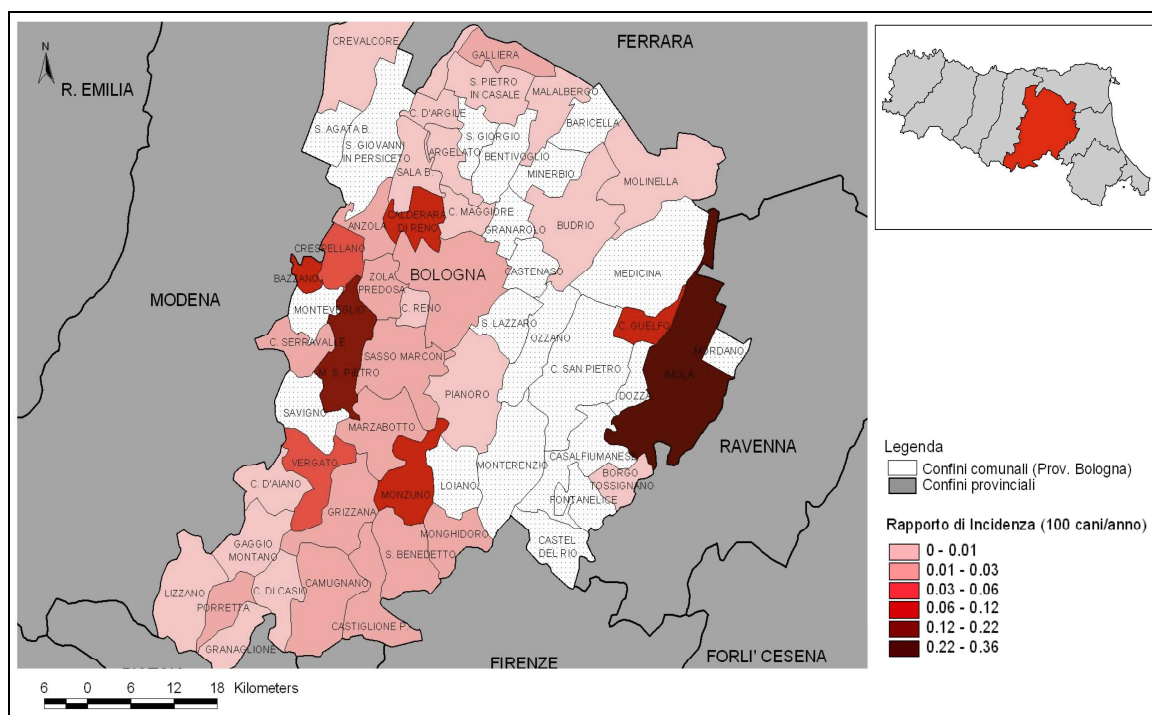


Mappa n. 17: Cani censiti per comune nella provincia di Bologna

I casi di LCan sono stati quindi normalizzati utilizzando come denominatore i dati sulla popolazione canina di proprietà censita nei singoli comuni; questa procedura è stata realizzata allo scopo di calcolare il rapporto di incidenza annuo (IR) e correggere le eventuali differenze nella frequenza dovute esclusivamente alle differenti consistenze numeriche delle popolazioni a rischio. L'IR calcolato per la provincia di Bologna variava tra 0,01 a 0,32 casi per 100 cani/anno. Valori di IR significativamente superiori sono stati registrati nei comuni di Imola (IR=0,32), Monte San Pietro (IR=0,19), Castel Guelfo (IR=0,11) e Calderara di Reno (IR=0,09) (Tabella 9, Mappa 18).

COMUNE	CASI LCan	POPOLAZIONE CANINA	CANE/ANNI	IR (100CANI/ANNO)
ANZOLA DELL'EMILIA	2	1239	11151	0,02
BAZZANO	4	596	5364	0,07
BOLOGNA	38	25175	226575	0,02
BORGTOSSIGNANO	1	900	8100	0,01
CALDERARA DI RENO	4	489	4401	0,09
CAMUGNANO	2	1214	10926	0,02
CASALECCHIO DI RENO	1	2484	22356	0,004
C. GUELFO DI BOLOGNA	1	104	936	0,11
C. DI SERRAVALLE	2	1135	10215	0,02
CASTEL MAGGIORE	2	1836	16524	0,01
CASTIGLIONE DEI PEPOLI	4	1601	14409	0,03
CREPELLANO	6	1286	11574	0,05
GAGGIO MONTANO	1	866	7794	0,01
GALLIERA	1	690	6210	0,02
GRIZZANA MORANDI	2	1065	9585	0,02
IMOLA	38	1306	11754	0,32
MARZABOTTO	3	2433	21897	0,01
MOLINELLA	2	1860	16740	0,01
MONGHIDORO	2	750	6750	0,03
MONTE SAN PIETRO	5	290	2610	0,19
MONZUNO	7	945	8505	0,08
PIANORO	1	2239	20151	0,004
PORRETTA TERME	1	663	5967	0,02
S. BENEDETTO VAL DI S.	3	1150	10350	0,03
SASSO MARCONI	5	2480	22320	0,02
VERGATO	4	941	8469	0,05
ZOLA PREDOSA	6	2241	20169	0,03

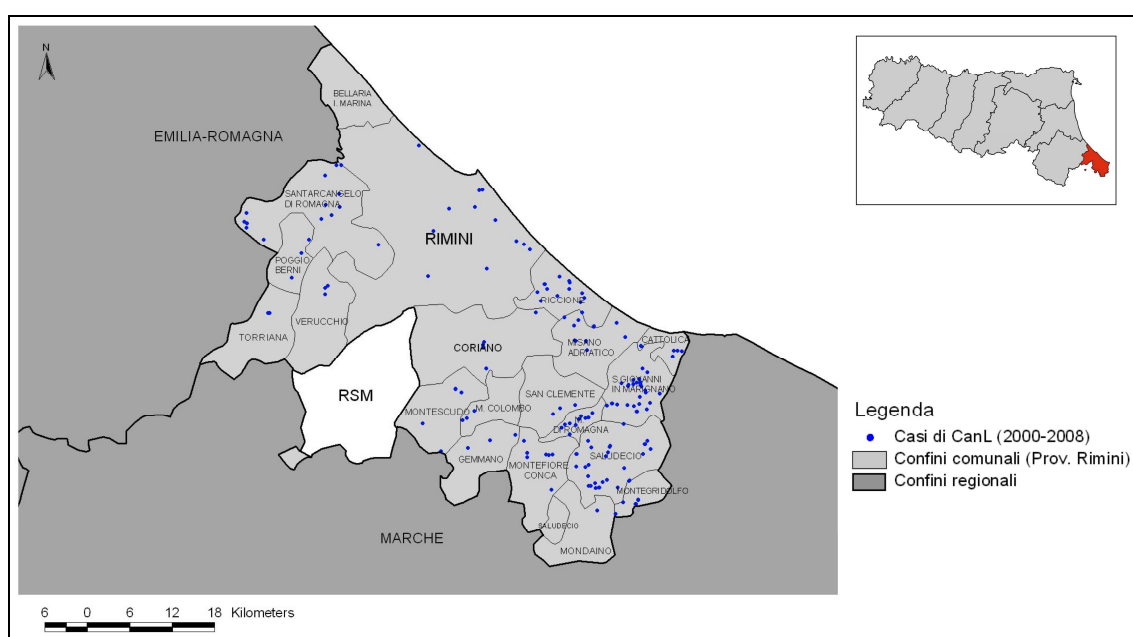
Tabella 9: Casi di LCan rapportati alla popolazione canina per alcuni comuni della provincia di Bologna (P<0,001)



Mappa n. 18: Rapporto di incidenza per la provincia di Bologna

PROVINCIA DI RIMINI

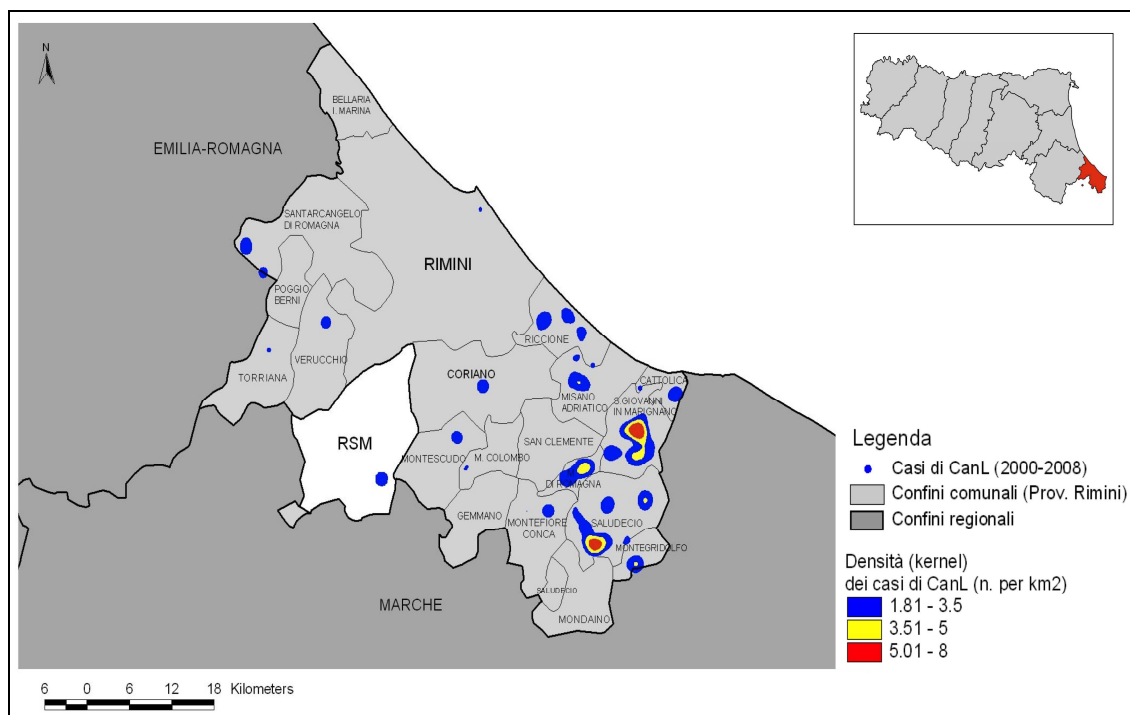
Nella provincia di Rimini sono stati notificati un totale di 204 casi di LCan. La singola posizione geografica dei casi notificati per questa provincia è rappresentata nella Mappa 19: i confini dei singoli comuni sono raffigurati in grigio chiaro e quelli dell'intera provincia in grigio scuro; con punti blu sono rappresentati i casi notificati nella provincia di Rimini.



Mappa n. 19: Casi di LCan notificati dal 2000 al 2008 nella provincia di Rimini

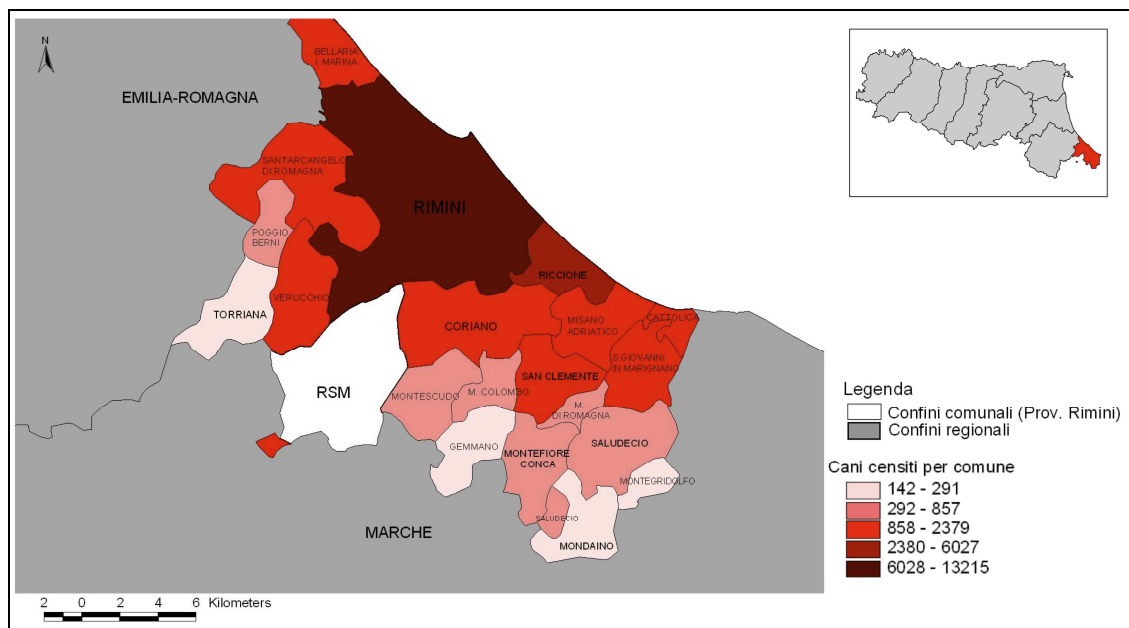
Mappa n. 20: Rappresentazione dei Comuni della provincia di Rimini relazione al numero di casi di LCan notificati nel territorio

La densità media dei casi di CanL è stata di 0,38 per km²; anche per questa provincia è stata osservata, in alcuni comuni, un maggiore indice di aggregazione spaziale dei casi con livelli di densità per km² significativamente superiori ai territori circostanti (Mappa 21)



Mappa n.21: Densità di casi di LCan nella provincia di Rimini

Così come per la provincia di Bologna, anche per quella di Rimini è stato accertato, ove possibile, dai registri delle anagrafi canine il numero di cani residenti. In base al dato, i comuni sono stati rappresentati con differenti tonalità di rosso: dal rosa, indicante comuni con una popolazione canina che arriva fino a circa 300 animali, al bordeaux, usato per i comuni in cui la popolazione canina arriva fino a più circa 13000 (Mappa n. 22).

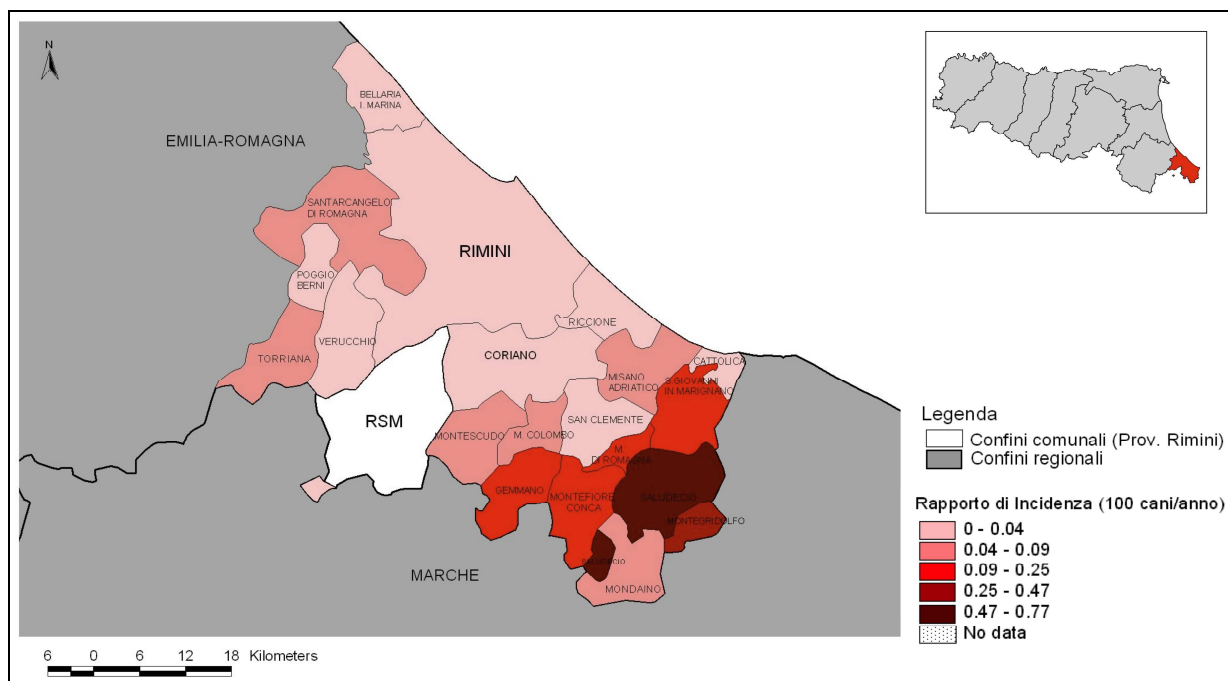


Mappa n. 22: Cani censiti per comune nella provincia di Rimini

L'IR calcolato per la provincia di Rimini variava tra 0,01 a 0,86 casi per 100 cani/anno. Valori di IR significativamente superiori sono stati registrati nei comuni di Saludecio (IR=0,77), Montegridolfo (IR=0,47), San Giovanni in Marignano (IR=0,25), Morciano di Romagna (IR=0,14), Montefiore Conca (IR=0,14) e Gemmano (IR=0,12) (Tabella 10; Mappa n. 23).

COMUNE	CASI LCAN	POPOLAZIONE CANINA	CANE/ANN I	IR (100CANI/ANNO)
CATTOLICA	6	2195	19755	0,03
CORIANO	5	2256	20304	0,02
GEMMANO	3	278	2502	0,12
MISANO ADRIATICO	11	1400	12600	0,09
MONDAINO	1	188	1692	0,06
MONTE COLOMBO	3	454	4086	0,07
MONTEFIORE CONCA	7	543	4887	0,14
MONTEGRIDOLFO	6	142	1278	0,47
MONTESCUDO	5	734	6606	0,08
MORCIANO DI ROMAGNA	11	857	7713	0,14
POGGIO BERNI	3	748	6732	0,04
RICCIONE	16	6027	54243	0,03
RIMINI	12	13215	118935	0,01
SALUDECIO	33	477	4293	0,77
S. CLEMENTE	3	1438	12942	0,02
S. GIOVANNI IN MARIGNANO	29	1292	11628	0,25
SANTARCANGELO DI R.	14	2379	21411	0,07
TORRIANA	2	291	2619	0,08
VERUCCHIO	3	1276	11484	0,03

Tabella 10: Casi di LCan rapportati alla popolazione censita per alcuni comuni della provincia di Rimini ($P < 0,0001$)



Mappa n.: 23: Rapporto di incidenza per la provincia di Rimini

DISCUSSIONE E CONSIDERAZIONI FINALI

Durante la realizzazione della banca dati, è stato possibile reperire informazioni riferibili a 538 casi di LCan verificatisi tra il 2000 e il 2008 in cani di proprietà. Il numero medio di notifiche è stato di 60 casi/anno, con un minimo di 42 nel 2002 e un massimo di 103 nel 2007. La maggioranza delle segnalazioni è pervenuta dalle province di Bologna e Rimini (235 e 204, rispettivamente).

In merito alla scansione temporale, valutando il numero delle segnalazioni “interne” per anno non è stato evidenziato alcun andamento particolare; diversa considerazione va fatta per quelle provenienti da veterinari liberi professionisti (VV.LL.PP.), per le quali si è apprezzato un incremento, passando da 7 notifiche nel 2000 a 84 nel 2007. Complessivamente si è avuto, nel tempo, un andamento altalenante delle notifiche, con alcuni picchi in corrispondenza dell’attivazione di programmi specifici di monitoraggio (Baldelli *et al.*, 2001; Mollicone *et al.*, 2003), quali ad esempio quelli previsti dal progetto *LeishMap*TM, attivo dal 2003 al 2005 con l’obiettivo di monitorare la diffusione dell’infezione e dei vettori nel nord Italia (Maroli *et al.*, 2008). Il maggior numero di segnalazioni registrato nel 2007 è sicuramente da mettere in relazione all’avvio del progetto regionale per la realizzazione di un sistema di sorveglianza della leishmaniosi in Emilia-Romagna, che ha stimolato da un lato la trasmissione delle notifiche pervenute alle Aziende Sanitarie Locali regionali, dall’altro la collaborazione dei VV.LL.PP.

Va anche tenuto nella giusta considerazione il fatto che il progetto prevedeva, tra le altre attività, anche incontri e giornate di formazione e informazione rivolti ai VV.LL.PP., allo scopo di attivare una sorveglianza passiva. Ciò potrebbe aver contribuito al numero considerevole di segnalazioni registrate nell’anno di inizio del progetto. La maggiore conoscenza e consapevolezza del problema “leishmaniosi canina” da parte dei VV.LL.PP. sono testimoniate dal dato che riguarda le notifiche esterne, per le quali è stato osservato un trend annuo in crescita.

In riferimento alle notifiche giunte dalle diverse province, si nota che il minor numero è pervenuto da Parma, mentre quello più consistente ha riguardato le

province di Bologna e Rimini. Il fatto che per le altre il numero di casi registrati sia notevolmente inferiore non va interpretato in maniera assoluta: un minor numero di segnalazioni non significa necessariamente che il territorio sia meno interessato dal problema. Il dato dovrebbe indurre a potenziare il monitoraggio della malattia in queste zone, anche mediante una maggiore sensibilizzazione degli operatori sanitari e del pubblico. In relazione ai dati giunti dalle province di Bologna e Rimini, va anche considerato che queste due aree in passato erano già state interessate dall'emergenza "leishmaniosi", evidenziata dalla comparsa di focolai stabili. Per la provincia di Bologna si ricordano il focolaio di Castel San Pietro Terme e Ozzano Emilia (Mollicone e Baldelli, 2003; Mollicone *et al.*, 2003) e quello di Montevoglio: il primo osservato nel territorio che agli inizi degli anni '70 fu interessato da un importante episodio di LVZ (Pampiglione *et al.*, 1974); il secondo messo in evidenza dalle attività del network scientifico *LeishMap*™ (Maroli *et al.*, 2008). Per la provincia di Rimini si menziona il focolaio inizialmente individuato nei comuni di San Giovanni in Marignano e Saludecio (Baldelli *et al.*, 1999; Baldelli *et al.*, 2001). Le indagini epidemiologiche svolte in passato in tali aree hanno sicuramente permesso l'instaurarsi di una vasta rete di conoscenze e relazioni professionali con veterinari pubblici e privati, che hanno giocato un ruolo fondamentale nella raccolta dei dati relativi ai casi di LCan. Da non trascurare è anche la presenza segnalata in tali aree, sia in passato sia recentemente, di casi umani autoctoni, che sicuramente hanno contribuito ad aumentare l'attenzione nei confronti di questa malattia e del suo serbatoio.

Relativamente all'origine dell'infezione è stato osservato un numero maggiore di casi autoctoni (147) rispetto a quelli d'importazione (97), con un rapporto 1,5:1. Estrapolando il dato si può ipotizzare che tale rapporto sia lo stesso anche in quei casi per i quali non è stato possibile accertare l'origine dell'infezione. Si può inoltre ragionevolmente supporre che tale rapporto si mantenga nel tempo con un'immissione costante nel territorio di casi autoctoni e non, entrambi coinvolti nel mantenimento e nell'aumento della pressione d'infezione e, quindi, nella stabilizzazione dei focolai.

La metodica maggiormente usata per l'accertamento diagnostico è stata l'IFI, *gold standard* diagnostico, che accoppia i più alti valori di sensibilità e specificità (OIE, 2008). L'associazione tra titolo IFI e *status* sanitario dei cani infetti ha evidenziato una correlazione statisticamente significativa: il rapporto sintomatici / asintomatici aumenta con l'incremento del titolo anticorpale. Tale dato trova corrispondenza in letteratura: per quanto elevati titoli anticorpali vengano osservati indifferentemente in animali sintomatici e asintomatici (Bourdoiseau *et al.*, 1997; Vercammen *et al.*, 2002), più frequentemente titoli anticorpali maggiori sono rilevati in animali con segni clinici rispetto ad animali clinicamente sani (Reis *et al.*, 2006).

L'analisi geografica ha confermato alcune osservazioni già avanzate dall'analisi descrittiva, quali ad esempio quelle relative all'andamento temporale delle notifiche (Mappe 1-9), e alla provenienza delle medesime (Mappa 11). All'interno delle province di Bologna e Rimini, i comuni maggiormente interessati sono stati Bologna, Castel San Pietro Terme e Imola, per la prima, Saludecio e Montegridolfo, per la seconda.

La rappresentazione olografica del territorio (Mappa 12) ha permesso di rilevare una maggiore distribuzione dei casi nelle aree collinari e pedemontane della regione, con una ripartizione pressoché lineare lungo la via Emilia. Tale concentrazione potrebbe riconoscere una motivazione ecologica in quanto tali aree costituiscono l'habitat preferenziale dei vettori, in particolar modo di *P. perfliewi* costantemente osservato nei focolai emiliano-romagnoli (Killick-Kendrick *et al.*, 1977; Baldelli *et al.*, 1999; Baldelli *et al.*, 2001; Mollicone *et al.*, 2003). La distribuzione lungo la via Emilia era già stata notata nel corso delle attività del *Leishmap*TM.

In considerazione del fatto che il numero di segnalazioni dalle varie province è stato disomogeneo ed al fine di non falsare i risultati, di seguito esporremo considerazioni unicamente riferite alle province di Bologna e Rimini, dalle quali sono pervenute il maggior numero di notifiche, con un flusso costante negli anni.

Nella provincia di Bologna sono stati individuati 4 importanti *clusters* di aggregazione in base alla densità di animali infetti/Km²: uno nel comune di

Monteveglia, uno nel comune di Bologna, uno al confine tra il comune di Ozzano e quello di Castel San Pietro Terme e un ultimo nel comune di Imola (Mappe n. 15 e 16). Analizzando i dati in relazione alla popolazione canina censita all'interno dei singoli comuni, si ottengono valori di IR significativamente superiori in 4 comuni della provincia. Due di questi (Imola e Monte San Pietro) costituiscono aree di focolaio stabile; gli altri due (Castel Guelfo e Calderara di Reno) sono caratterizzati da territori pianeggianti e intensamente coltivati che sembrerebbero non eco-compatibili con la presenza del vettore di trasmissione. Nel territorio della provincia di Rimini sono stati individuati 3 importanti *clusters* di aggregazione: uno a San Giovanni in Marignano, uno a Saludecio e uno a Morciano di Romagna (Mappa 21), nei quali sono stati registrati valori di IR significativamente superiori. A questi se ne aggiungono altri (Monte Grido, Montefiore Conca e Gemmano), tutti compresi nell'area del focolaio ormai stabile (Baldelli *et al.*, 2001), che dimostra evidenti segni di espansione sul territorio della provincia.

L'utilizzo della tecnologia GIS nello studio dell'epidemiologia territoriale della LCan ha consentito, da un lato, di avere conferme di situazioni già note e, dall'altro, di individuare alcuni punti sui quali focalizzare l'attenzione, ai fini del monitoraggio e del controllo della malattia.

In riferimento ai risultati ottenuti per le province di Bologna e Rimini, un dato interessante è l'aver osservato nei *clusters* di aggregazione individuati una densità di animali infetti fino a 8 animali/km². Ciò fa di queste zone dei punti caldi dell'epidemiologia del territorio, nei quali si potrebbero instaurare focolai stabili di infezione, in considerazione anche del fatto che il vettore avrebbe a disposizione un numero notevole di cani infetti. Interpretando il dato con una chiave di lettura diversa, ciò potrebbe voler dire che in queste zone, dove il tasso di insediamento urbano è alto, esisterebbe anche un reale rischio di trasmissione dell'infezione all'uomo. A tal proposito occorre sottolineare come in provincia di Rimini, a partire dal 2003, anno di notifica del primo caso autoctono di LVZ, siano stati complessivamente osservati 7 casi di malattia nell'uomo, 3 dei quali nell'ultimo anno (Tasini, AUSL di Rimini, comunicazione personale).

I dati sopra riportati inducono interessanti riflessioni.

Se da un lato i nostri risultati potrebbero essere stati condizionati dalle disomogeneità nella provenienza delle segnalazioni, influenzata dai rapporti con il territorio, dall'altro la successiva elaborazione conferma che le due province sono interessate da una situazione di endemia stabile, rafforzata annualmente con la comparsa di un notevole numero di nuovi casi.

Pur avendo calcolato l'incidenza relativa annua solo in quei comuni per i quali è stato possibile reperire il dato demografico del 2009, i valori ottenuti in due aree di una regione a bassa intensità di trasmissione (Maroli *et al.*, 2008) sono paragonabili a quelli osservati in regioni iperendemiche (Paradies *et al.*, 2006; Otranto *et al.*, 2007).

L'applicazione in Italia delle tecnologie GIS per il controllo della LCan è recente e fa riferimento a soli due lavori prodotti da Brianti *et al.* (2007) e Poglayen *et al.* (2008): nel primo è stato applicato il sistema GIS per la realizzazione di un *Health Information System* (HIS) ai fini della sorveglianza della leishmaniosi nell'area urbana della città di Messina; nel secondo il sistema è stato utilizzato per uno studio retrospettivo sui casi di LCan verificatisi in zone collinari e pedecollinari di un'area orientale della regione Emilia-Romagna tra le province di Bologna e Ravenna.

I vantaggi e le potenzialità dell'applicazione di queste tecnologie all'epidemiologia della LCan sono notevoli e di facile comprensione. La tecnologia GIS ha permesso di aggiungere alle conoscenze già in nostro possesso note importanti riguardo i *clusters* di aggregazione. Queste potrebbero essere utili nell'intraprendere azioni correttive volte, se non all'eliminazione del problema, al suo arginamento e controllo, in considerazione dell'importanza che la malattia riveste in ambito sia veterinario sia umano.

II PARTE

LA DIAGNOSI DELLA LEISHMANIOSI

PREMESSA

La diagnosi della LCan presenta ancora oggi delle carenze, nonostante siano stati fatti dei notevoli miglioramenti nella messa a punto di tecniche diagnostiche dirette e indirette.

Ad una metodica diagnostica efficace, sia essa diretta che indiretta, si chiede, oltre che di essere in grado di confermare un sospetto clinico e rilevare l'infezione in un soggetto asintomatico, di essere caratterizzata da alti valori di sensibilità, specificità e riproducibilità. In via del tutto teorica dovrebbe essere in grado di evidenziare tutti gli animali infetti, impiegando preferenzialmente substrati il cui campionamento non sia invasivo e molesto per l'animale (Maia e Campino, 2008).

Un'accurata diagnosi è indispensabile sia in relazione alle problematiche di sanità animale che la malattia comporta, sia in riferimento al suo carattere zoonotico.

La diagnosi dell'infezione nel serbatoio animale riveste un ruolo di importanza primaria per la gestione dei singoli cani e per la sorveglianza e il controllo della diffusione dell'infezione nella popolazione umana.

LA DIAGNOSI DELLA LEISHMANIOSI CANINA

Il polimorfismo sintomatologico della leishmaniosi canina (LCan) rende difficile fare riferimento unicamente alla diagnosi clinica, in quanto aspecifica. Si impone così un approccio diagnostico integrato che tenga in considerazione anche i risultati delle analisi diagnostiche dirette e indirette, al fine di confermare casi sospetti clinici e individuare soggetti infetti asintomatici.

DIAGNOSI CLINICA E DIFFERENZIALE

La diagnosi clinica è problematica per il fatto che il 50-60% dei cani infetti non mostra sintomatologia riferibile alla LCan (Oliva *et al.*, 2004). A questo va aggiunta la poliedricità delle manifestazioni cliniche che nei casi più comuni sono linfadenomegalia, lesioni cutanee, pallore delle mucose, perdita di peso, onicogrifosi, febbre, letargia, disoressia, splenomegalia, insufficienza renale, lesioni oculari, epistassi e artropatie. In presenza della forma alopecica-desquamativa, si consiglia di effettuare diagnosi differenziale, valutando le demodicosi, i disturbi di cheratizzazione, l'adenite sebacea e la piodermite come probabili cause di questa forma clinica. Le lesioni ulcerative devono essere differenziate dal *lupus* eritematoso, dalle micosi profonde e dalle forme neoplastiche. La forma nodulosa deve essere distinta da forme tumorali cutanee, granulomi sterili e dermatofibrosi nodulari, mentre le malattie a carattere pustoloso, quali la piodermite, il pemfigo foliaceo e la demodicosi vanno distinte dalla forma pustolosa di LCan. In presenza di sintomatologia sistemica, si vaglia la possibilità di essere davanti ad un caso di ehrlichiosi epatozoonosi o babesiosi (Scarampella e Novi, 2000). Inoltre, sono sempre più frequenti le forme atipiche della malattia a carico dell'apparato cardiovascolare, digestivo e respiratorio (Blavier *et al.*, 2001).

DIAGNOSI DI LABORATORIO

La diagnosi di laboratorio si rende indispensabile sia per confermare un caso clinico sospetto sia per individuare soggetti infetti asintomatici, anch'essi responsabili della trasmissione dell'infezione.

Gli esami di laboratorio si dividono in aspecifici e specifici; mediante i primi vengono misurati alcuni parametri ematobiochimici che risultano alterati in corso di leishmaniosi; i secondi permettono di fare una diagnosi di certezza.

ESAMI ASPECIFICI

Sono esami di routine che permettono di evidenziare il coinvolgimento generale dell'organismo e gli organi più colpiti dalla malattia. Inoltre, tali indagini, eseguite con regolarità in un paziente leishmaniotico, risultano utili nell'indicare le condizioni del paziente anche in relazione alla risposta terapeutica.

Esame emocromocitometrico: mette in evidenza alterazioni quali:

- anemie, che generalmente sono arigenerative normocromiche e normocitiche (Kontos e Koutinas, 1993);
- trombocitopenie che sono associate alla riduzione della capacità aggregante delle piastrine (Corona *et al.*, 2003);
- neutrofilie, solitamente dovute a lesioni secondarie cutanee o renali (Ciaramella *et al.*, 1997).

Velocità di eritrosedimentazione (VES): l'aumento di questo parametro in corso di leishmaniosi è dovuto alla formazione di aggregati eritrocitari, che hanno una velocità di caduta nel plasma maggiore delle singole emazie. La formazione di tali aggregati è dovuta principalmente alla presenza di immunocomplessi sulla membrana dei globuli rossi e all'aumento delle β e γ globuline.

Esame ematobiochimico: rileva alterazioni quali protidemia, creatinemia, azotemia, oltre che alterazioni a carico degli enzimi epatici.

Le proteine totali, in cani affetti da leishmaniosi possono superare i 10 g/dl (valore normale: 6 g/dl) (Urquhart *et al.*, 2002) e solo in caso di grave compromissione renale possono scendere al di sotto della norma.

Il tracciato sieroelettroforetico in un soggetto leishmaniotico, evidenzia iperglobulinemia, ipoalbuminemia ed inversione del rapporto albumine/globuline (Ciaramella *et al.*, 1997).

L'iperglobulinemia è data da un aumento delle β e γ globuline, dovuto ad un aumento di immunoglobuline aspecifiche e di auto-anticorpi (Kontos e Kountinas, 1993). L'ipoalbuminemia è causata da un feed-back negativo indotto dall' iperglobulinemia, oltre che da un ridotto assorbimento enterico, da una diminuita sintesi epatica e da perdita attraverso l'emuntorio renale. Come conseguenza di ciò, il rapporto albumine/globuline, che normalmente è di circa 1, si abbassa fino a 0,4-0,1.

La sieroelettroforesi risulta essere fondamentale per il monitoraggio dell'andamento della parassitosi in corso di terapia, e ripetuta periodicamente, permette di individuare precocemente le recidive in animali trattati.

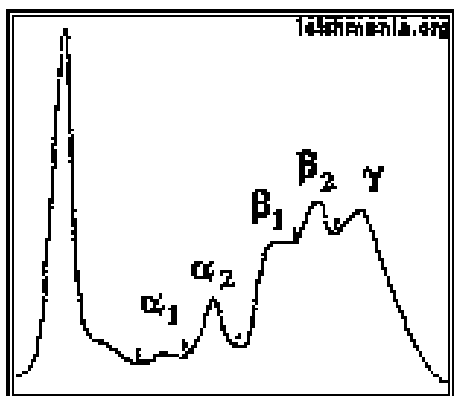


Figura 9: Proteidogramma di un cane leishmaniotico
(www.leishmania.org)

Per quanto riguarda i valori di creatinemia e azotemia, questi aumentano quando il danno renale interessa almeno il 75% dei nefroni. La rilevazione delle variazioni di questi parametri in corso di leishmaniosi è importante come dato prognostico e terapeutico; infatti nel caso di un paziente leishmaniotico con insufficienza renale concomitante è opportuno, prima di instaurare una terapia specifica, attuare un'adeguata terapia di supporto.

Per quanto riguarda gli enzimi epatici, un loro aumento può suggerire la necessità di un trattamento terapeutico a dosaggi ridotti e diluito nel tempo.

Esame delle urine: è in grado di rilevare proteinuria e talvolta cilindruria, soprattutto nei soggetti nefropatici asintomatici.

ESAMI SPECIFICI

Gli esami specifici possono essere diretti e indiretti. I primi portano all'evidenziazione del parassita, i secondi consentono di rilevare la risposta immunitaria stimolata dal microrganismo nell'animale.

ESAMI DIRETTI

A questo gruppo fanno capo i tests diagnostici che consentono di fare diagnosi di leishmaniosi in maniera certa solo se il risultato è positivo; in caso contrario non si può escludere con certezza l'infezione in quanto il parassita potrebbe non essere stato rilevato perché presente in concentrazione bassa. Tra gli esami diretti si annoverano gli esami parassitologici e quelli molecolari.

Metodi Parassitologici

Gli esami parassitologici consentono di fare diagnosi definitiva di leishmaniosi mediante l'osservazione del parassita in forma amastigote nei tessuti e negli organi infetti, o in forma promastigote in coltura. Tanto l'esame citologico/istologico quanto quello colturale hanno una specificità del 100%, ma non possono vantare altrettanta sensibilità (Scarampella e Novi, 2000); inoltre il materiale di partenza per l'allestimento di queste prove si ottiene generalmente mediante procedure invasive, nel caso trattasi di aspirato midollare e linfonodale, ai quali si aggiungono sangue periferico o campioni di cute (Maia e Campino, 2008). In considerazione di ciò, solitamente questi esami non sono la scelta d'elezione per effettuare diagnosi definitiva in soggetti asintomatici (Alvar *et al.*, 2004).

ESAME CITOLOGICO

I preparati citologici vengono colorati con May-Gruenewald-Giemsa e l'osservazione al microscopio permette di distinguere le forme amastigoti all'interno dei macrofagi o libere negli spazi extracellulari (Scarpella e Novi, 2000). Si presentano come corpi ovali o tondeggianti con un diametro di 2-4 μ con un citoplasma blu pallido e un nucleo allargato (Maia e Campino, 2008). Se il campionamento viene fatto a partire da organi lesionati, si possono osservare delle alterazioni citologiche riferibili a leishmaniosi, quali ad esempio flogosi linfoplasmocellare, iperplasia reattiva linfonodale, ipoplasia eritroide nel midollo osseo. Nel caso in cui non siano apprezzabili lesioni riferibili alla malattia, è preferibile campionare midollo osseo, linfonodo, milza e sangue (Castagnaro *et al.*, 2007) In riferimento alla sensibilità dell' esame, in bibliografia si possono leggere risultati differenti.

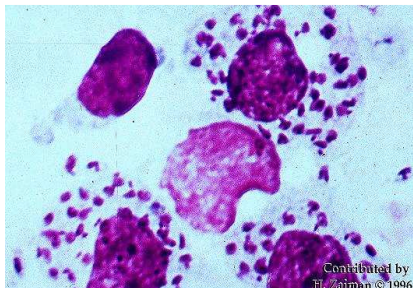


Figura 11: Amastigoti all'interno dei macrofagi in un preparato citologico (Zaiman,1996).

Ferrer (1999) riporta per l'esame citologico, effettuato a partire da aspirato midollare, una sensibilità del 60% a fronte di un valore del 30 % se l'esame viene condotto a partire da aspirato linfonodale. Diverse sono le percentuali riferite da Alvar *et al.* (2004): 60-75% per l'esame citologico dell'aspirato linfonodale e 40-50% per quello midollare. Mylonakis *et al.* (2005) riferiscono di aver individuato forme amastigoti del parassita da puntato linfonodale nel 96% dei soggetti con sintomatologia clinica e nel 25% dei soggetti subclinici, giungendo alla conclusione che l'esame citologico linfonodale risulti positivo in soggetti con sintomatologia clinica piuttosto che in quelli in fase subclinica, ma senza correlazione tra la densità di amastigoti osservati e la severità della sintomatologia.

ESAME ISTOLOGICO

Il parassita può essere osservato anche in sezioni allestite da lesioni tessutali, previa colorazione con ematossilina-eosina. Oltre al parassita, si possono apprezzare anche alterazioni compatibili con la LCan, come ad esempio infiammazioni linfoplasmacellulari, dermatopie ischemiche, iperplasia linfoide a carico di milza e linfonodi (Castagnaro *et al.*, 2007). Generalmente, si consiglia il ricorso a tale esame quando, nonostante un esame citologico negativo, persiste il forte sospetto di leishmaniosi. A fronte di un'alta specificità del test, si ha una bassa sensibilità dovuta anche al fatto che il quadro istopatologico osservabile non è patognomonico di LCan, a meno che non sia apprezzabile la presenza del parassita (Ferrer, 1999). Per questo tipo di analisi vengono impiegati campioni autoptici o biotici di diversi organi. Moreira *et al.* (2007) hanno analizzato diversi substrati campionati da 89 cani divisi in tre gruppi in base alla sintomatologia osservata (sintomatici, asintomatici e oligosintomatici). Scopo del lavoro era confrontare i risultati ottenuti da indagini istologiche condotte su linfonodi, milza, midollo osseo e fegato. I valori di sensibilità osservati sono stati differenti a seconda del substrato e dello stato clinico dell'animale. Per i linfonodi è stata trovata una sensibilità del 39% nei soggetti asintomatici, del 40% nei soggetti oligosintomatici e del 43% nei soggetti sintomatici; per la milza i valori osservati sono stati 38% negli asintomatici, 40% negli oligosintomatici e 43% nei sintomatici; per il midollo osseo sono state osservate percentuali diverse: 21% in animali asintomatici, 12% negli oligosintomatici e 26% nei sintomatici. Le percentuali più basse sono state trovate per il fegato: 26% in cani sintomatici, 12% in cani oligosintomatici e 13% in cani asintomatici. Dai risultati ottenuti, il linfonodo sembra essere il substrato più adatto per effettuare un'analisi istologica.

E' stata valutata anche la possibilità di analizzare biopsie cutanee, in considerazione della facilità di esecuzione del prelievo e delle elevate concentrazioni del parassita in tali lesioni. Al fine di stabilire se la scelta della zona anatomica per effettuare una biopsia cutanea possa avere delle ricadute sui risultati dell'esame istologico, Xavier *et al.* (2006) hanno effettuato indagini

su campioni biotici di cute prelevati da orecchio, naso e addome, confrontando i valori di sensibilità osservati con quelli ottenuti con la *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e l'immunoistochimica effettuata sugli stessi campioni. L'esame istologico ha riportato una sensibilità del 44% rispetto al 82% della PCR e al 62% dell'immunoistochimica, ma il quesito di partenza è rimasto irrisolto.

Un'alternativa alla colorazione con ematossilina-eosina è rappresentata dalle colorazioni immunoistochimiche, che prevedono l'impiego di anticorpi (Ab) diretti contro gli antigeni (Ag) di *Leishmania*. L'immunoistochimica può essere un valido supporto per la conferma della diagnosi di LCan quando non è facile identificare il parassita con la sola osservazione al microscopio e quando il pattern istologico fa chiaramente riferimento alla malattia. Xavier *et al.* (2006) indicano una sensibilità del 62% circa per l'immunoistochimica effettuata su biopsie cutanee fissate in paraffina, rispetto al 44% riportato dall'analisi degli stessi campioni effettuata con la colorazione ematossilina-eosina.

Tafari *et al.* (2004) propongono l'utilizzo di un siero iperimmune di cane infetto naturalmente da *L. chagasi* come Ab primario e di un Ab anti-ratto biotinilato come Ab secondario, in grado poi di reagire con il complesso streptavidina-perossidasi. La metodica è stata applicata a preparati di milza, fegato, linfonodi, midollo osseo, reni e cute, analizzati anche con la colorazione istologica classica. Per tutti gli organi esaminati il protocollo sperimentale ha riportato una sensibilità maggiore rispetto a quella ottenuta con l'analisi istologica classica. Si è voluto inoltre valutare la specificità dell'Ab primario impiegato, processando i campioni anche con un Ab monoclonale anti-lipofosfoglicano di *Leishmania*. I risultati ottenuti hanno rilevato che il siero iperimmune, impiegato come Ab primario, è tanto specifico quanto l'Ab monoclonale saggiato in parallelo. E' da sottolineare anche il fatto che l'impiego di un Ab secondario aspecifico non ha inficiato la prova, in quanto si è osservata cross-immunoreazione.

Tenendo in considerazione tutti questi fattori associati al fatto che il protocollo assicurerebbe un risparmio economico, gli Autori suggerirebbero l'utilizzo della tecnica.

E' da tenere in considerazione che qualunque sia la tecnica impiegata per rivelare la presenza del parassita nei tessuti, molto dipende dall'esperienza del

tecnico e dalla sua abilità nell'identificare le forme amastigoti. Altra considerazione da fare è che si potrebbero avere dei falsi negativi, dovuti alla bassa carica parassitaria, o dei falsi positivi per la presenza di artefatti (Maia e Campino, 2008).

ESAME COLTURALE



Figura 12: Promastigoti di *L.infantum* in coltura
(www.pasteur.it).

Ha lo scopo di aumentare il numero di parassiti presenti originariamente nei prelievi, risultando quindi utile qualora l'esame microscopico risulti negativo, ma persista il sospetto di infezione. Sebbene l'esame sia caratterizzato da una specificità del 100%, non viene impiegato di routine a causa dei lunghi tempi richiesti (minimo 7 giorni), della elevata probabilità di contaminazioni batteriche e della difficoltà del parassita ad adattarsi al mezzo di coltura (Maia e Campino, 2008). Al momento non ci sono dati bibliografici rispetto ad un specifico mezzo di coltura che assicuri più di altri una buona resa in termini di quantità di parassita ottenuto. Per la messa in coltura di *Leishmania* spp. possono utilizzarsi terreni difasici o terreni liquidi. I primi sono solitamente costituiti da una fase solida, addizionata con sangue defibrinato di coniglio, e da una fase liquida, con l'aggiunta di antibiotici, per prevenire eventuali contaminazioni batteriche, all'interno della quale i parassiti si moltiplicano. Generalmente per i tentativi di isolamento si prediligono terreni a base di agar-sangue come *Novy, McNeil and Nicolle* (NNN), il *Brain-heart infusion* (BHI) o l'*Evan's modified Tobie's medium* (EMTM) (OIE, 2008), nei quali si raggiungono alte concentrazioni di parassita. Da annoverare anche il terreno monobasico *Schneider's Drosophila medium* addizionato con il 2% di urina umana, che

consente di arrivare ad una concentrazione di 10^8 cellule/ml, utile per la preparazione dell'antigene da utilizzare in indagini sierologiche e per la caratterizzazione isoenzimatica dei ceppi.

I tentativi di isolamento vengono fatti a partire da aspirati midollari, linfonodali, o da biopsie cutanee. I terreni inoculati vengono mantenuti a una temperatura compresa tra 22°C e 26°C e vengono osservati settimanalmente. La presenza del parassita può essere apprezzata già alla prima settimana, ma più spesso è necessario effettuare più subcolture prima di osservarlo al microscopio; per questo motivo vengono effettuati dei passaggi ciechi fino a 4-5 settimane dal primo inoculo prima di dichiarare negativo il tentativo di isolamento (Maia e Campino, 2008). Sebbene sia un'analisi indaginosa che richiede dei tempi di risposta troppo lunghi per essere impiegata come metodica diagnostica di routine, l'esame colturale trova il suo impiego per altri scopi. E' infatti la metodica che permette di ottenere un numero di parassiti sufficienti per la caratterizzazione isoenzimatica dei ceppi isolati, che viene effettuata solo presso laboratori specializzati. La tecnica si rende indispensabile anche per l'allestimento dell'Ag impiegato nei protocolli ELISA, Western Blot ed IFI, e per la messa a punto di modelli di infezioni sperimentali (Maia e Campino, 2008). L'esame colturale è un'indispensabile fase preliminare anche nella messa a punto di analisi farmacologiche condotte *in vitro* per lo studio di principi attivi o farmaci impiegati nella terapia della leishmaniosi, in quanto si tratta di indagini che richiedono un'alta concentrazione di parassiti.

Si potrebbe quindi pensare alla tecnica colturale come ad un supporto indispensabile per analisi più semplici, piuttosto che come ad una metodica diagnostica in senso stretto.

PROVA BIOLOGICA

Un'alternativa al tentativo di isolamento *in vitro* mediante terreni di coltura è rappresentato dal tentativo di isolamento *in vivo* mediante animali da laboratorio. L'animale d'elezione per questo tipo di indagine è il criceto (*Mesocricetus auratus*).

Il materiale clinico prelevato da animali sospetti di infezione viene inoculato nel naso o nel piede prevalentemente per via intradermica. La malattia si sviluppa dopo settimane o mesi, con noduli o ulcere a livello del sito di inoculo, e dopo mesi si può avere una massiccia infezione degli organi interni (OIE, 2008).

In considerazione dei tempi lunghi per ottenere un risultato e della esigenza di evitare, per quanto possibile, l'utilizzo di animali a scopi sperimentali, la prova biologica è attualmente abbandonata come prova diagnostica, tranne in casi in cui si ravvisi rischio di contaminazioni del materiale.

XENODIAGNOSI

Il metodo consiste nel far nutrire sul cane sospetto un certo numero di flebotomi che verranno successivamente esaminati per osservare la presenza di promastigoti nel tratto intestinale (Castagnaro *et al.*, 2007). Indagini volte a comprovare l'infettività di un animale per il vettore sono state svolte nel Mediterraneo per le specie *P. perniciosus* e *P. perfiliowi* e in Sud America per accertare il coinvolgimento nella diffusione dell'infezione da parte di *Lutzomyia longipalpis* (Maia e Campino, 2008). L'utilizzo della tecnica in campo diagnostico è abbastanza limitato in quanto è necessario avere ambienti adeguatamente attrezzati nei quali sia possibile il mantenimento di una colonia di flebotomi.

Il suo impiego è attualmente limitato ad indagini volte a chiarire la competenza vettoriale di specie di flebotomi e il ruolo epidemiologico svolto da specie animali il cui ruolo nella diffusione dell'infezione non è del tutto chiaro, come nel caso del gatto, possibile serbatoio del parassita.

Metodi Molecolari

POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

La metodica, altamente sensibile e specifica, consente di amplificare esponenzialmente *in vitro*, una o più specifiche sequenze nucleotidiche,

partendo dall'acido desossiribonucleico (DNA). I diversi protocolli di PCR messi a punto sono utili non solo per determinare la presenza del parassita durante la fase attiva dell'infezione, ma anche per monitorare l'esito dei trattamenti farmacologici.

Fondamentale, per una corretta esecuzione della tecnica, è la scelta dei *primers*: possono essere utilizzati *primers* universali, che amplificano sequenze conservate comuni a diverse specie del genere *Leishmania*, oppure *primers* specie-specifici. Proprio la scelta degli oligonucleotidi è stata il punto focale del lavoro di Lachaud *et al.* (2002), che hanno confrontato i risultati ottenuti impiegando 6 diverse coppie di *primers*: 3 prevedevano l'amplificazione di porzioni del DNA genomico, mentre le altre 3 coppie avevano come target il DNA Kinetoplastico. Tutti i protocolli testati si sono rilevati efficienti in termini di specificità e riproducibilità dei risultati, ma la sensibilità variava considerevolmente in base al target eletto: i tre protocolli che amplificavano il DNA genomico sono stati in grado di rilevare da 2 a 5 parassiti per 1 ml di sangue, mentre i *primers* che amplificavano il DNA Kinetoplastico hanno riportato una più spiccata sensibilità (10^{-3} parassiti/ml). Nonostante tutti i protocolli proposti siano in grado di rilevare la presenza di DNA parassitario nel sangue di cani, gli Autori ipotizzano che l'utilizzo delle metodiche più sensibili possano essere un valido aiuto nel rilevare i soggetti infetti asintomatici e quelli nei quali non è ancora apprezzabile la risposta anticorpale.

Altro fattore da tenere in considerazione nell'allestimento della PCR è il substrato di partenza: sangue intero, cellule mononucleate del sangue periferico (*buffy coat*), puntato midollare, puntato linfonodale, biopsia cutanea e tampone congiuntivale. Reale *et al.* (1999), mettono a confronto i risultati ottenuti a partire da sangue intero e aspirato linfonodale, utilizzando come target una sequenza di circa 100 paia di basi (bp) del DNA kinetoplastico. I valori di sensibilità e specificità sono stati migliori quando la PCR veniva allestita partendo da DNA estratto da puntato linfonodale: 100% e 100% contro 85% e 80% ottenuti per la PCR su sangue. Dovendo anche tener presente la praticità della metodica, non si può non considerare che prelevare un campione

di sangue è molto più semplice che non fare un prelievo linfonodale, tanto più che i linfonodi sono più facilmente apprezzabili quando sono reattivi.

Il sangue è stato giudicato un substrato soddisfacente da Ikononopoulos *et al.* (2003), se paragonato con il puntato midollare, probabilmente in relazione al fatto che la semplicità del campionamento permetterebbe il prelievo di un campione di materiale più cospicuo. Differenti possibili substrati sono stati vagliati anche da Solano-Gallego *et al.* (2001), che hanno messo a punto una PCR in grado di amplificare una sequenza di 120 bp del DNA Kinetoplastico, a partire da campioni di puntato midollare, tampone congiuntivale e biopsia cutanea. I valori di positività riscontrati sono stati: 17% a partire da puntato midollare, 32% da tampone congiuntivale e 51% da biopsia cutanea. Gli Autori ipotizzano che la cute rappresenterebbe il substrato migliore per una diagnosi molecolare dell'infezione, in considerazione del fatto che una maggiore positività in PCR a partire da biopsia cutanea rispecchierebbe la biologia del parassita, in quanto la cute è il tessuto più accessibile per il vettore. Un analogo lavoro di confronto tra diversi substrati è stato fatto anche da Manna *et al.* (2004). Nello studio sono stati esaminati campioni di sangue, cute e aspirato linfonodale sui quali è stata allestita una PCR che amplifica una sequenza di 116 bp del DNA cinetoplastico. Anche in questo caso la cute si è rivelata un buon substrato per le indagini molecolari con una percentuale di sensibilità del 95%. Leggermente diversa è l'opinione di Maia *et al.* (2009) che recentemente sono giunti alla conclusione che a scopo diagnostico i migliori substrati siano il puntato midollare e quello linfonodale mentre, ai fini epidemiologici, PCR eseguite a partire da sangue intero possano fare da corollario ai risultati ottenuti mediante indagini sierologiche. Negli ultimi anni l'attenzione dei Ricercatori si è soffermata sul possibile impiego di tamponi congiuntivali come materiale di partenza per la diagnosi biomolecolare di leishmaniosi.

Strauss-Ayali *et al.* (2004), amplificando la regione ITS1 della sequenza codificante per l'operone ribosomiale, a partire da tampone congiuntivale, hanno ottenuto una specificità del 100% e una sensibilità del 92%, valori sovrapponibili a quelli ottenuti impiegando substrati differenti, il cui reperimento richiede interventi più invasivi per l'animale. Ferreira *et al.* (2008) hanno posto

l'attenzione anche sulla modalità di estrazione del DNA da tamponi congiuntivali, valutando due diversi protocolli di estrazione: il primo prevedeva l'impiego del cloroformio, mentre il secondo prevedeva l'ebollizione del campione. In entrambi i casi il DNA estratto è stato sottoposto a PCR per l'amplificazione di una sequenza di 120 bp della regione conservata del DNA del mini circolo del Kinetoplasto. Si è osservato che l'estrazione del DNA con cloroformio assicurava una sensibilità maggiore (91%) di quella registrata con l'altra procedura (73%).

Il vantaggio dell'impiego di questo substrato sta nel fatto che il campionamento non prevede una procedura invasiva, è semplice e veloce da effettuare e incontra un largo consenso tra i proprietari dei cani da esaminare.

Sulla scorta dei risultati ottenuti da Strausss-Ayali *et al.* (2004) e da Ferreira *et al.* (2008), Pilatti *et al.* (2009) si sono soffermati sulla scelta della sequenza da amplificare. Gli Autori hanno analizzato 4 possibili protocolli di PCR con i quali si amplificava una regione del minicircolo del Kinetoplasto o la regione intergenica non codificante del gene per RNA ribosomiale (ITS-1 nPCR): maggiori riscontri si sono ottenuti quando il target era costituito dal DNA del Kinetoplasto.

Oltre alla PCR qualitativa, che è stata finora esaminata, in letteratura sono presenti diversi lavori che propongono l'applicazione di sue variabili: si tratta della nested-PCR e della PCR *Real Time*.

La nested-PCR (n-PCR) consiste in due amplificazioni successive, eseguite mediante due coppie di *primers* specifici, diverse per ciascuna reazione; in particolare la coppia di *primers* utilizzati nella seconda PCR usa come target il prodotto di amplificazione della prima PCR, di cui amplifica una regione interna. Fisa *et al.* (2001), hanno eseguito una n-PCR su 19 cani risultati positivi in ELISA, utilizzando come substrati puntato midollare, puntato linfonodale e *buffy coat*. Tutti i soggetti sono risultati positivi in n-PCR quando questa è stata eseguita su *buffy coat*, mentre il protocollo applicato a puntato midollare e linfonodale ha dato esito positivo in 11 e 8 casi, rispettivamente. Gli Autori hanno enfatizzato il fatto che la n-PCR avesse dato esito positivo anche in quei soggetti che, avendo riportato all'analisi risultati vicini al valore di *cut off*,

sarebbero stati considerati dubbi, con una eventuale sottostima della reale situazione.

Il *buffy coat* è il substrato impiegato anche in uno studio condotto da Gramiccia *et al.* (2002). La n-PCR in questo caso è stata impiegata per amplificare una porzione conservata del gene SSUrRNA, codificante per l'rRNA 18S del genere *Leishmania*. I risultati ottenuti indicano come la n-PCR a partire da *buffy coat* sia una tecnica sensibile e specifica, oltre ad avere il vantaggio di causare minor disagio all'animale al momento del campionamento.

Lo stesso protocollo è stato applicato da Oliva *et al.* (2006) durante uno studio longitudinale condotto su 43 beagles. In questo caso però la n-PCR è stata allestita su puntato linfonodale e midollare; da quest'ultimo si sono ottenuti i migliori risultati in termini di sensibilità e specificità.

La PCR *Real Time* permette di quantificare il DNA presente nel campione in esame, consentendo così di ottenere una stima della carica parassitaria. La PCR *Real Time* si può realizzare tramite l'impiego di coloranti intercalanti, come il SYBER Green, che si legano in maniera aspecifica alla doppia elica di DNA, oppure mediante l'impiego di sonde ad ibridazione specifiche per il frammento di interesse, marcate con molecole fluorescenti, come le sonde TaqMan (Gomes *et al.*, 2008; Maia e Campino, 2008). I vantaggi della PCR *Real Time* rispetto alla PCR qualitativa sono il minor rischio di contaminazioni e la maggiore sensibilità al fine di stimare la carica parassitaria (Mortarino *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2008; Otranto, 2009).

La PCR *Real Time* è un valido strumento per il monitoraggio del trattamento dei cani infetti (Manna *et al.*, 2004) e per formulare ipotesi di recidiva associata alla concentrazione parassitaria tissutale persistente dopo trattamento; potrebbe inoltre essere impiegato come supporto per la valutazione della necessità di effettuare un trattamento preventivo in soggetti infetti asintomatici (Mortarino *et al.*, 2004). Anche nel caso della variante quantitativa, è stata vagliata la possibilità di impiegare differenti substrati quali sangue, puntato linfonodale, puntato midollare o biopsia cutanea. In riferimento all'impiego della metodica per il controllo del follow up terapeutico sono stati espressi pareri favorevoli circa l'impiego del sangue come substrato migliore, anche in considerazione

della facilità di campionamento (Franceschi *et al.*, 2005; Francino *et al.*, 2006; Manna *et al.*, 2006; Tabar *et al.*, 2008).

La PCR, in tutte le sue varianti, presenta indubbi vantaggi: minor dispendio di tempo rispetto a quello richiesto dall'isolamento, nessun vincolo con la vitalità del parassita (Gramiccia *et al.*, 2002; Di Muccio *et al.*, 2004), specificità sovrapponibile a quella della metodica di isolamento. La PCR presenta però anche degli aspetti negativi come gli alti costi di esecuzione e la necessità di strutture e personale qualificato, aspetti questi che limitano l'impiego routinario della tecnica. Altra considerazione è che non esiste una correlazione diretta tra positività alla PCR e infettività per il vettore, in quanto le infezioni rilevate possono essere di tipo criptico-latente, in cui si ha presenza scarsa o nulla di parassiti vitali nel derma e/o sangue periferico del cane (Gradoni, 2002). Altro limite è la scarsa standardizzazione della metodica; a tutt'oggi persistono infatti difformità relative al campione di partenza e al target da amplificare (Reale *et al.*, 1999; Gramiccia *et al.*, 2002; Di Muccio *et al.*, 2004; Manna *et al.*, 2004; Paglia *et al.*, 2004; Brianti *et al.*, 2005).

Un' ultima considerazione: la positività in PCR indica che l'animale ha avuto un contatto con il parassita, ma non si può affermare con certezza che svilupperà la malattia e quando ciò avverrà (Oliva *et al.*, 2006). Questo ha delle ricadute sulla decisione di trattare o meno un soggetto risultato positivo in PCR, ma clinicamente sano. Allo stato attuale delle cose, diversi Autori non raccomandano il trattamento di questi soggetti, o per lo meno consigliano di completare l'accertamento diagnostico con esami sierologici.

Altri esami diretti

Liarte *et al.* (2001) propongono l'impiego del Quantitative Buffy Coat (QBC ®) per una rapida evidenziazione della forma amastigote del parassita nel sangue periferico, riportando una sensibilità del 96%: le cellule della serie bianca del sangue vengono separate mediante centrifuga e gli amastigoti vengono visualizzati al microscopio a fluorescenza usando un tubo da microematocrito con le pareti ricoperte da *acridine orange* e ossalato di potassio. L'esito positivo

ottenuto su soggetti asintomatici e la rapidità del test ne suggerirebbero un largo impiego nella diagnostica. A tutt'oggi non sono però disponibili sufficienti dati in bibliografia.

ESAMI INDIRETTI

In questo gruppo di esami sono incluse tutte quelle prove che attestano l'avvenuto contatto con il parassita, evidenziando la risposta immunitaria del soggetto. Sono compresi nella categoria le metodiche sierologiche e il test intradermico.

Metodi Sierologici

Sono tecniche diagnostiche mediante le quali viene messa in evidenza la presenza di anticorpi (Ab) anti-leishmania nel siero dell'ospite. Il loro ampio impiego è giustificato da una serie di fattori di natura economica e pratica, in quanto si tratta, nella maggior parte dei casi, di tecniche caratterizzate da costi contenuti e da una certa rapidità di esecuzione. La loro importanza aumenta se si tiene in considerazione la poliedricità delle manifestazioni cliniche e la scarsa sensibilità dei metodi parassitologici. Nonostante queste considerazioni, non sempre possono essere l'unico test di valutazione, sebbene siano caratterizzati da buoni valori di specificità e sensibilità. Quando si ottiene un titolo anticorpale dubbio, si rende necessario un approfondimento diagnostico mediante l'impiego di tecniche dirette. Da considerare anche la possibilità di false positività dovute a cross-reazioni con altri patogeni, come quelle riscontrabili nel continente americano a causa della diffusione di *Trypanosoma cruzi*, ottenute in analisi che prevedono l'impiego dell'intero parassita come antigene (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Va ricordata anche la possibilità di registrare dei falsi negativi nel caso il soggetto si sia infettato recentemente e non sia ancora possibile rilevare la presenza di Ab anti-*Leishmania* a causa dell'"effetto finestra": dal momento

dell'infezione al momento in cui sono apprezzabili Ag specifici nel siero nell'animale possono passare anche diversi mesi. Ciò vuol dire che se un soggetto viene esaminato durante questo lasso di tempo, con alta probabilità risulterà negativo ad indagine sierologica, ma questo non significa necessariamente che il parassita non sia presente.

Tra le metodiche sierologiche si ricordano:

IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA (IFI)



Figura13: IFI, siero positivo di cane (www.dspvpa.unibo.it)

Secondo *L'Organization Mondial de la Santé Animal* rappresenta la metodica "Gold Standard" (OIE, 2008), per scopi diagnostici, screening di massa e comparazione con diverse metodiche sierologiche. E' la tecnica che, a tutt'oggi, in aree nelle quali non si ha circolazione di altri patogeni (ad esempio altre specie di *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi*) con il quale si possono avere problemi di cross-reattività, garantisce i più alti valori di sensibilità (96%) e specificità (98%).

Per la sua esecuzione vengono impiegati promastigoti fissati su vetrino, come Ag. La presenza di Ab specifici nel siero in esame viene svelata con l'aggiunta di Ab anti-Ig di specie, coniugati con isotiocianato di fluoresceina che, in sieri positivi, conferisce ai promastigoti una netta fluorescenza verde brillante, in seguito all'osservazione al microscopio a luce ultravioletta. Il risultato viene espresso in titolo anticorpale e il valore soglia è pari alla diluizione 1:40. Cani che presentano titoli anticorpali di 40 e 80 vengono considerati sospetti, nel

senso che potrebbero essere animali resistenti oppure preclinici. Tali soggetti devono essere saggiati in IFI a distanza di mesi oppure con altra metodica affidabile. Titoli ≥ 160 sono considerati indici di infezione, anche in assenza di sintomatologia (Gradoni *et al.*, 2004).

Sono disponibili in letteratura diversi lavori nei quali la tecnica viene impiegata come test d'elezione per la diagnosi o viene confrontata con altre metodiche sierologiche. Mancianti *et al.* (1988) in una indagine condotta su 88 sieri di cane mediante IFI, emoagglutinazione indiretta e counterimmunolettroforesi, riportano per IFI un valore di sensibilità del 100%, mentre percentuali inferiori si registrano per l'emoagglutinazione indiretta e la counterimmunolettroforesi, a seconda che i cani mostrino una severa sintomatologia clinica, siano oligosintomatici o asintomatici (65,4%, 60% e 54,5%, rispettivamente per l'emoagglutinazione, 96,1%, 80% e 72,7%, rispettivamente per la counterimmunolettroforesi). La specificità dell'IFI è stata del 100%, uguale a quella riscontrata per l'emoagglutinazione indiretta; con la counterimmunolettroforesi è stato invece osservato un valore del 100% per animali non infetti e del 90,4% testando soggetti positivi per altre infezioni. Quando i sieri sono stati saggiati ad alte diluizioni ($\geq 1:320$) si è registrata una sostanziale concordanza tra le tre metodiche, mentre alle diluizioni inferiori alla positività in IFI non sempre ha corrisposto una positività anche nelle altre metodiche. Questo aspetto ha importanza soprattutto inquadrato in un discorso di monitoraggio della diffusione della malattia, in quanto giocano un ruolo importante anche i soggetti asintomatici che non hanno ancora sviluppato una forte risposta immunitaria nei confronti dell'infezione.

Mancianti *et al.* (1995) hanno anche confrontato la metodica IFI con l'Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), saggiando 290 sieri di cane provenienti da una zona endemica dell'Italia centrale. E' stata trovata correlazione tra i risultati riportati in IFI e in ELISA (sensibilità del 98,4% per l'IFI e del 99,5% per l'ELISA; specificità del 100% per l'IFI e del 97,1% per l'ELISA), in quanto le differenze osservate non sono risultate statisticamente significative. I risultati ottenuti indicano quindi che sia l'IFI sia l'ELISA riportano esiti simili e possono

essere considerati due validi strumenti da utilizzare in studi sieroepidemiologici nella popolazione canina.

Lo stesso gruppo ha poi confrontato l'IFI con un protocollo dot-ELISA (Mancianti *et al.*, 1996), applicato su 235 sieri di cani provenienti dall'Isola d'Elba, zona endemica per la leishmaniosi. Per l'IFI sono stati osservati valori di sensibilità e specificità più alti (98,7% e 100%, rispettivamente) rispetto a quelli ottenuti saggiando i sieri in dot-ELISA (91,9% e 86%, rispettivamente). Anche in questo caso, similmente a quanto osservato nel precedente lavoro (1988), si è osservato una corrispondenza di risultati quando si saggiavano i sieri a diluizioni $\geq 1:320$, mentre si riportavano falsi negativi in dot-ELISA per quei sieri che in IFI avevano dato risultato positivo a diluizioni inferiori. Sebbene il dot-ELISA abbia dei vantaggi di tipo pratico rispetto all'IFI, non è possibile rilevare con questa metodica le infezioni subcliniche, messe invece in evidenza dall'IFI. Valori di sensibilità più bassi sono riportati da De Castro Ferreira *et al.* (2007) in un lavoro in cui 234 sieri di cani venivano saggiati in IFI, ELISA e Agglutinazione Diretta (DAT). Per l'IFI è stata riportata una sensibilità del 72% e una specificità del 100%, tenendo in considerazione solo i soggetti provenienti da zona endemica. Più alti valori di sensibilità e specificità sono invece stati registrati per ELISA e DAT: 96% e 100% per la prima e 93% e 100% per la seconda. Quando nello studio sono stati inclusi anche 20 cani che erano risultati positivi per altri patogeni (*Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensis*, *Toxoplasma gondii* e *Ehrlichia canis*), il valore di specificità dell'IFI è sceso al 45% in quanto in 11 casi è stata osservata cross-reazione, mentre la specificità di DAT è stata del 95% e quella dell'ELISA è scesa al 60%. In riferimento alla possibilità di osservare delle cross reazioni impiegando l'IFI come tecnica sierologica, va fatto un commento: il lavoro di De Castro Ferreira *et al.* (2007) è stato effettuato in Brasile, dove oltre alla circolazione di *L. infantum* si registra anche la presenza di *L. braziliensis*, con la quale si possono avere delle cross-reattività; questa però non è una questione che a tutt'oggi interessa il Bacino del Mediterraneo e in particolar modo l'Italia, in quanto in quest'area non circolano altre specie di *Leishmania* oltre a *L. infantum*, né altri patogeni cross-reagenti.

L'IFI ha trovato un largo impiego per la diagnosi della leishmaniosi per svariati motivi: a) semplicità e possibilità di standardizzare il protocollo di preparazione dell'Ag; b) facilità di allestimento della prova; c) rapidità con la quale si ottiene l'esito d) costo relativamente contenuto (Romero-Peñuela e Sanchez-Valencia, 2007). La metodica presenta però anche delle limitazioni. La positività in IFI viene rilevata dopo 5-8 mesi dal contatto con il parassita. Di conseguenza, nel corso di indagini epidemiologiche condotte alle nostre latitudini, il monitoraggio sierologico è opportuno che sia eseguito nel periodo febbraio-maggio, al fine di evidenziare la risposta anticorpale ad un'infezione contratta nella precedente stagione di trasmissione. Infine, l'IFI non è un test adeguato a monitorare l'andamento del trattamento terapeutico, in quanto non sembra esserci correlazione tra titolo anticorpale e gravità dei sintomi (Gravino, 2004). Altro aspetto che va considerato è il fatto che l'esito della prova dipende anche dal grado di preparazione specialistica del personale di laboratorio. A queste valutazioni va aggiunta l'osservazione fatta da Natale *et al.* (2005), che fanno notare come il risultato dell'IFI possa risentire anche negativamente della cattiva conservazione del siero da saggiare.

ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

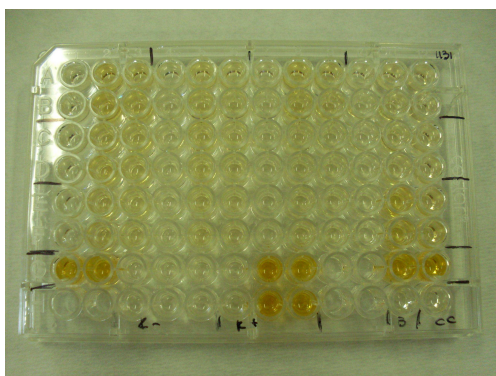


Figura14:Piastra allestita per l'analisi ELISA

E' un test immunoenzimatico che prevede l'impiego di un Ab marcato con un enzima e il substrato dell'enzima stesso al fine di evidenziare l'avvenuta reazione Ag-Ab. L'Ag adsorbito passivamente alle pareti del pozzetto delle piastre da microtitolazione, viene messo a contatto con il siero in esame; dopo

l'incubazione vengono aggiunti Ab anti-immunoglobuline di specie marcati con l'enzima. Se nel siero sono presenti anticorpi anti-leishmania si realizza il legame Ag-Ab-anti Ab marcato, che viene messo in evidenza a seguito dell'aggiunta del substrato dell'enzima. In caso di positività si verifica una reazione colorimetrica osservabile visivamente o quantificabile allo spettrofotometro.

La prova si presta sia alla diagnostica di routine sia ad indagini epidemiologiche per la semplicità di allestimento del test; è apprezzabile una certa versatilità della metodica in quanto possono essere impiegate diverse tipologie di coniugato e di Ag come il parassita *in toto*, Ag purificati, peptidi di sintesi o proteine ricombinanti.

Sono diverse le metodiche ELISA che sono state messe a punto per la diagnosi di leishmaniosi.

Nel 2003 Solano-Gallego *et al.* hanno messo a punto un protocollo ELISA che prevede l'impiego della proteina A-perossidasi come coniugato, applicato alla ricerca di Ab nelle urine. Gli Autori hanno rilevato una correlazione statisticamente significativa tra la proteinuria, causata dall'infezione, e la presenza di Ab anti-leishmania nelle urine dei cani esaminati; ciò lo renderebbe un valido supporto per il monitoraggio del follow up terapeutico. L'impiego inoltre della proteina A come Ab secondario, aumenterebbe la sensibilità della metodica in quanto la reattività della proteina A con tutte le sottoclassi di IgG e parzialmente con quelle di IgM e IgA è abbastanza forte.

La possibilità di impiegare Ag e Ab secondari diversi è stata valutata anche da Mettler *et al.* (2005), determinando i valori di sensibilità e specificità con l'impiego come Ag della forma promastigote e di quella amastigote, e con l'utilizzo come Ab secondari di Ab-anti-IgG(γ), Ab-anti-IgG2, Ab-anti-IgG H+L, Ab-anti-IgG1. Si è osservato che tutti i protocolli basati sull'impiego di promastigoti e amastigoti come Ag in combinazione con Ab-anti-IgG(γ), Ab-IgG2, Ab-anti-IgG H+L, assicuravano valori di sensibilità del 100% in soggetti sintomatici e del 94%-100% in cani asintomatici. Al contrario, usando come Ab secondari Ab-anti-IgG1, i valori di sensibilità scendevano al 33% e 41%, rispettivamente in soggetti sintomatici e asintomatici. I valori di specificità invece

si sono mantenuti su livelli alti (dal 96% al 100%), indipendentemente dal tipo di Ab secondario impiegato. Le diverse sensibilità registrate con l'impiego di Ab anti-IgG1 e Ab-anti-IgG2, sarebbero giustificate dal fatto che, nonostante le due sottoclassi siano apprezzabili in soggetti infetti, le anti-IgG2 sembrerebbero essere predominanti. Alla luce dei risultati ottenuti, per ragioni pratiche, l'utilizzo dei promastigoti come Ag è preferibile a quello delle forme amastigote in quanto i primi sono la forma del parassita che più facilmente si mantiene in coltura.

Il possibile impiego di Ag diversi è stato valutato anche da Candido *et al.* (2008), confrontando i risultati ottenuti saggiando 60 sieri di cane con due metodiche ELISA: *Crude Total antigen*-ELISA (CTA-ELISA), in cui veniva impiegata come Ag la forma promastigote *in toto* e *Fucose-Mannose ligand*-ELISA (FML-ELISA), in cui l'Ag consisteva nel complesso glicoproteico fucosio-mannosio estratto dalla superficie di *Leishmania donovani*. Utilizzando CTA-ELISA si sono osservati valori di sensibilità del 90% in cani sintomatici e del 86% circa nei soggetti oligosintomatici; la specificità è stata del 93,3% in soggetti sintomatici e del 100% nel caso di soggetti oligosintomatici. Per FML-ELISA si sono trovati valori di sensibilità più bassi, rispetto alla CTA-ELISA, quando si trattava di animali sintomatici (86,7%) e leggermente più alti quando gli animali erano oligosintomatici (90%); in riferimento alla specificità, si è ottenuto un 96,7% in soggetti sintomatici e 93,3% in quelli oligosintomatici.

L'analisi dei risultati non ha rilevato delle differenze statisticamente significative, suggerendo che il fattore discriminante per la scelta di un protocollo con l' Ag *in toto* piuttosto che un altro nel quale si utilizza una frazione antigenica, è di natura pratica: la preparazione per l'Ag *in toto* è certamente più facile e standardizzabile oltre che più economica, se paragonata a quella di un Ag purificato. Gli Autori osservano però che con l'impiego di un Ag *in toto* si potrebbero avere problemi di cross-reattività, qualora il cane esaminato sia positivo per *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Babesia canis* o *Dirofilaria immitis*.

Tra le alternative ai protocolli di ELISA convenzionali si annovera anche il dot-ELISA. Si tratta di una variante qualitativa che deve il suo nome (letteralmente "a pois") al fatto che piccole quantità di Ag solubile, sottoforma di gocce,

vengono adsorbite su fogli di nitrocellulosa, sui quali viene dispensato una piccola quantità del siero ignoto, per verificare poi visivamente l'avvenuto legame Ag-Ab. La metodica venne messa a punto agli inizi degli anni '80 e, complice la semplicità dell'allestimento della prova, venne applicata con successo per la sierodiagnosi della leishmaniosi nell'uomo. Dati i buoni risultati in termini di sensibilità e specificità ottenuti in campo umano, diversi Autori hanno proposto il suo utilizzo anche in campo veterinario.

Dietze *et al.* (1995) saggiando in dot-ELISA 130 sieri di cane e confrontando i risultati ottenuti con quelli dell'esame citologico da midollo, hanno osservato valori di sensibilità e specificità del 97% e del 100%, rispettivamente.

I valori di sensibilità e specificità della tecnica sono stati valutati da Mancianti *et al.* (1996) relativamente alla tecnica di riferimento IFI. I valori di sensibilità del dot-ELISA si sovrapponevano a quelli registrati dall'IFI (91,9% del dot-ELISA contro il 98,7% dell'IFI), ma lo stesso non si è potuto affermare per la specificità (87% per il dot-ELISA e 100% per IFI). Gli Autori hanno ipotizzato che l'impiego di proteine antigeniche purificate, al posto dei promastigoti, potrebbe contribuire ad aumentare la specificità della metodica, come riportato da Jeffe e Zalis (1988) che hanno impiegato la tecnica in una indagine siero epidemiologica nell'uomo.

Migliori, in termini di sensibilità e specificità, i risultati ottenuti da Fisa *et al.* (1997) impiegando il dot-ELISA in una indagine sieroepidemiologica condotta su cani residenti in Catalogna. Sensibilità e specificità sono state entrambe del 100%, saggiando il siero alla diluizione 1:400, mentre la sensibilità è calata al 90% quando i sieri esaminati erano diluiti 1:800. Si potrebbe giustificare i valori di specificità e sensibilità più alti osservati da Fisa *et al.* rispetto a quanto riportato da Mancianti *et al.* (1996) con il fatto che gli Autori abbiano scelto di impiegare un Ab secondario polivalente come la proteina A, in grado di reagire in maniera più forte con Ig appartenenti a classi diverse e di diverse specie animali. Il protocollo così strutturato potrebbe essere utilizzato nell'ambito di indagini svolte allo scopo di svelare il possibile ruolo epidemiologico di altre specie animali in aree endemiche.

Nel suo complesso la metodica riporta notevoli vantaggi pratici: di semplice allestimento, poco dispendioso in termini economici in quanto richiede piccole quantità di reagenti, svincolato dalla necessità di avere a disposizione uno spettrofotometro. Tutto queste caratteristiche fanno sì che il dot-ELISA sia una metodica adatta anche al lavoro di campo. Uno svantaggio è però rappresentato dalla lettura soggettiva dei risultati che lo rende estremamente dipendente dall'esperienza del personale di laboratorio che esegue la prova.

La necessità di ottenere un esito in tempi molto rapidi ha portato alla messa a punto di diversi protocolli ELISA. Ferroglio *et al.* nel 2007 propongono un protocollo ELISA rapido con il quale saggiare anche il sangue intero. Mettendo a confronto i risultati ottenuti dallo Snap® CLATK con quelli conseguiti con IFI e Western Blot, si hanno dei valori di sensibilità e specificità molto buoni: 91,1% e 99,2 % rispetto all'IFI; 93,4% e 98,4% comparando i risultati con quelli ottenuti in Western Blot. I valori di sensibilità e specificità riportati dal test rapido in esame sono sicuramente più alti rispetto a quelli di altri tests in commercio. Un test rapido sensibile e specifico sarebbe un valido complemento ad un protocollo diagnostico da approntare a livello ambulatoriale, oltre che per effettuare uno *screening* di massa in lavori di monitoraggio su grandi numeri. Poter affermare con un buon margine di certezza se un animale è infetto o no, avrebbe delle ricadute positive sul controllo dell'epidemiologia dell'infezione. Come anche suggerito da Ferroglio *et al.* (2007) un test immunologico di questo tipo va affiancato a prove sierologiche quantitative, esami diretti e analisi cliniche.

Alle metodiche ELISA fin ora descritte vanno aggiunti i protocolli che prevedono l'impiego di un Ag ricombinante. Alla loro base c'è la tecnologia del DNA ricombinante che consente di clonare geni codificanti proteine antigeniche di *L. infantum*; i geni inseriti in costrutti di clonaggio, singolarmente o in combinazione tra loro, vengono poi espressi *in vitro* e il prodotto dell'espressione viene impiegato come Ag in analisi sierologiche.

Numerosi sono gli Ag ricombinanti che sono stati testati ma, a tutto'oggi, nonostante i risultati ottenuti, sono commercializzati solo l' Ag rK39 e un Ag chimerico (Soto *et al.*, 1998).

La rK39 è una proteina espressa da una sequenza ripetuta presente nel gene che codifica per una proteina *kinesin-related*, prodotta principalmente dalla forma amastigote.

Sulla scia degli studi condotti da Burns *et al.* (1993), Scalone *et al.* (2002) hanno sviluppato e standardizzato un protocollo ELISA che utilizza l'Ag rK39. I valori di sensibilità e specificità ottenuti (97,1% e 99,4%, rispettivamente) erano del tutto sovrapponibili a quelli dell'IFI (99,4% e 99,6%, rispettivamente), considerata metodica di riferimento nello studio. Anche la rK39-ELISA, al pari dell'IFI, non è in grado di rilevare i primissimi stadi dell'infezione, a causa della latenza sierologica.

Soto *et al.* (1998) suggeriscono l'impiego di un Ag chimerico, composto dalle frazioni ribosomiali LiP2a, LiP2b e LiP0 in associazione con l'epitopo contenuto nell'istone H2A, da impiegarsi in un protocollo *Falcon Assay Screening Test-ELISA* (FAST-ELISA). Tale Ag chimerico veniva ottenuto mediante l'inserimento delle singole regioni codificanti per gli epitopi di interesse in un plasmide che ne permettesse l'espressione. I valori di sensibilità e specificità ottenuti sono stati soddisfacenti: 93% e 100%, rispettivamente.

Rosati *et al.* (2003) propongono l'impiego degli Ag ricombinanti rK39sub, K9 e K26, singolarmente o in associazione tra loro. I risultati, in termini di sensibilità e specificità, sono stati buoni e in accordo con quelli ottenuti saggiando gli stessi sieri in IFI. In particolare i dati ottenuti da K26-ELISA hanno mostrato una maggiore concordanza con i risultati ottenuti in IFI. Lo stesso Ag K26 sembrerebbe in grado di rilevare casi d'infezione in animali con titolo anticorpale dubbio in IFI. L'impiego di Ag ricombinanti ha delle ricadute positive in termini di specificità, ma se si prevede l'impiego di singole molecole ricombinanti si potrebbe avere un effetto negativo in termini di sensibilità.

Il lavoro di Boarino *et al.* (2008) si è proposto di stimare i valori di sensibilità e specificità di un' ELISA che impiega diversi Ag ricombinanti in associazione tra loro.

Sono stati valutati 2 protocolli ELISA: in uno veniva impiegata la forma promastigote come Ag (*Leishmania*-96, Agrolabo), nell'altro si utilizzava un Ag ricombinante ottenuto dalla fusione delle principali regioni immunodominanti di

L. infantum (Leishmacheck RP, Agrolabo). I valori di sensibilità riportati dai due protocolli sono stati simili (93% con Leishmacheck RP contro 94% con Leishmania-96); per la specificità sono state registrate le maggiori differenze: 97% per Leishmacheck RP e 88% per Leishmania-96. I risultati ottenuti con Leishmacheck RP inoltre hanno mostrato una concordanza dell'89% con quelli ottenuti in IFI, a fronte del 84% di concordanza riportato da Leishmania-96. I risultati confermano un miglioramento in termini di specificità degli Ag ricombinanti, in particolar modo quando questi vengono impiegati in associazione tra loro, come già verificato da Soto *et al.* (1998)

Un'Ag di tutt'altra natura è stato impiegato in un recente lavoro di Rajasekariah *et al.* (2008). Gli Autori hanno messo a punto una metodica ELISA che prevede l'utilizzo di un *cocktail* di antigeni secreti da ceppi di *L. infantum*, *L. donovani* e *L. major*. La novità della metodica sta nel fatto che, impiegando contemporaneamente Ag di specie diverse, il protocollo si può impiegare in diverse aree endemiche, in cui si ha la circolazione di differenti specie di *Leishmania* spp. Il raffronto con i risultati ottenuti con IFI e DAT testimoniano anche buoni valori di sensibilità e specificità.

I vantaggi dei diversi protocolli ELISA possono essere così riassunti:

- riproducibilità e obiettività dei risultati;
- possibilità di automatizzazione, e quindi di analisi di un numero elevato di campioni contemporaneamente;
- possibilità di impiegare Ag di natura differente.

Nonostante i vantaggi di tipo pratico sopra elencati, si nota che le metodiche ELISA mostrano valori di specificità e sensibilità inferiori all'IFI quindi, pur essendo di rapida lettura non la possono sostituire.

WESTERN BLOT (WB)

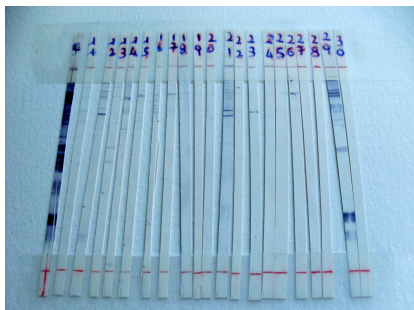


Figura 15: Strisce di nitrocellulosa per WB

E' una tecnica sierologica che permette di evidenziare la presenza di una data proteina, di interesse antigenico, mediante il riconoscimento da parte di Ab specifici; in generale, la miscela di proteine antigeniche viene prima separata in base al peso molecolare utilizzando un gel di poliacrilammide (SDS-Page: *sodio dodecilsolfatopolyacrylamide gel electrophoresis*) e successivamente si ha il trasferimento su una membrana di nitrocellulosa. Tale membrana viene quindi esposta al siero in esame; l'eventuale presenza di Ab anti-*leishmania* viene svelata aggiungendo Ab anti-Ig di specie marcati con un enzima e il relativo substrato cromogeno (Poli, 1996).

Nonostante siano stati pubblicati numerosi studi, ancora non si è giunti a definire un pattern di bande correlato all'infezione o alla malattia. Alcuni dei fattori che probabilmente non permettono di arrivare ad un quadro chiaro sono l'impiego di Ag differenti e di diversi protocolli nella preparazione dei gel di separazione (Aisa M.J. *et al.*, 1998). Marty *et al.* (1995), saggiando in WB sieri di pazienti con leishmaniosi cutanea o viscerale residenti in una zona endemica della Francia, hanno osservato che le bande elettroforetiche che permettevano di fare diagnosi di leishmaniosi erano quelle con massa molecolare di 18, 21, 23 e 31 kDa.

Allo scopo di individuare dei marker diagnostici dei primi stadi d'infezione, Aisa *et al.* (1998) hanno condotto uno studio su cani residenti in Catalogna, proponendo di fare riferimento agli Ag di 14 e 12 kDa, con i quali reagivano sieri di cani asintomatici con bassi titoli anticorpali in dot-ELISA. Tale metodica ha mostrato sensibilità e specificità elevate (95,8% e 100%, rispettivamente),

compatibili con i valori osservati da Rami *et al.* (2005) per le frazioni antigeniche di 14 e 16 kDa.

Alle osservazioni fatte da Aisa *et al.* (1998) in riferimento alle frazioni antigeniche di 14 e 16 k si aggiungono le considerazioni avanzate da Talmi-Frank *et al.* nel 2006, che hanno identificato le bande di 12-, 14-, 24-, 29-, 48-, e 68-kDa come indicative di infezione in atto; inoltre il rilevamento di queste bande è apprezzabile già 4-6 settimane dopo l'infezione, quando ancora altre metodiche sierologiche, quali rK39-ELISA e CLA-ELISA (*Crude Leishmania antigen-ELISA*) danno esito negativo.

In uno studio condotto allo scopo di comprendere la risposta anticorpale in cani sottoposti a trattamento terapeutico, Fernández-Pérez *et al.* (1999) hanno osservato che la presenza di bande corrispondenti ad Ag del peso molecolare di 26 kDa è indicativa di infezione in atto. Tale banda, saggiando i sieri dei cani dopo il trattamento, non era più apprezzabile, in concomitanza con un miglioramento clinico dei soggetti. Simile osservazione sul valore diagnostico dell'Ag 26 kDa era stata già fatta da Vercammen *et al.* (1997) che suggerivano anche di osservare la reattività nei confronti dell'Ag di 67 kDa allo scopo di valutare l'efficacia terapeutica dei farmaci.

Lasri *et al.* (2003) hanno indicato come frazioni antigeniche utili al fine di valutare l'efficacia terapeutica quelle di peso molecolare di 85 kDa e 110 kDa; inoltre, in associazione con la banda elettroforetica di 26 kDa hanno osservato la presenza di bande elettroforetiche paragonabili alle frazioni antigeniche di 58 kDa, gp63 e gp70.

Ferroglio *et al.* (2007) suggeriscono un diverso pattern di bande: la positività ad almeno due delle bande con peso molecolare di 169, 115, 66 o 33 kDa è considerata sufficiente ai fini diagnostici. I risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli conseguiti con IFI e con Snap® CLATK, osservando un buon grado di concordanza.

Nonostante la buona resa in termini di sensibilità e specificità della metodica, il suo impiego risulta tutt'ora limitato. Da un punto di vista pratico l'allestimento della prova risulta troppo laboriosa e lunga, per poter essere applicata nella routine diagnostica. Va inoltre segnalata la necessità di avere del personale di

laboratorio esperto nelle varie fasi della prova; la difficoltà non risiede tanto nell'interpretazione dei risultati, quanto nella manualità che i tecnici devono acquisire nelle singole fasi del processo per non invalidarne l'esito. A queste osservazioni va aggiunto che il fatto di non poter fare riferimento ad un pattern specifico di bande per decretare la positività o meno dei soggetti saggiati, rende ancora più difficile l'applicazione della prova.

AGGLUTINAZIONE DIRETTA (DAT)

La metodica prevede l'impiego come Ag della forma promastigote del parassita, che in presenza di Ab specifici dà reazione di agglutinazione.

I vantaggi di questa tecnica sono di natura essenzialmente pratica: estrema semplicità nell'allestimento, addestramento minimo del personale addetto alla prova, bassi costi e possibilità di processare un certo numero di campioni in poco tempo (Da Silva *et al.*, 2006).

Va considerato che i valori di sensibilità e specificità sono molto vincolati al *cut off* fissato.

Mohebbi *et al.* (2004) osservano valori di sensibilità e specificità del 70,9% e 84,9%, rispettivamente, assumendo come valore soglia il titolo 1:320. Da Silva *et al.* (2006), confrontando i risultati ottenuti utilizzando l'IFI e la DAT, riportano un valore di specificità del 91%, adottando 1:400 come valore soglia. Sensibilità del 70,3% e specificità del 100% sono riportati da Mikaeili *et al.* (2007), con riferimento ad un valore soglia di 1:3200. Le percentuali salgono al 93,4% (sensibilità) e 96,9% (specificità) con un *cut off* di 1:100 e seguendo un diverso protocollo per l'allestimento dell'Ag (Oliveira *et al.* 2009). Valori simili vengono riportati anche da De Castro Ferreira *et al.* (2007): specificità del 100% e sensibilità del 93%.

Un'alternativa alla DAT è rappresentata dal *Fast Agglutination Screening Test* (FAST), proposto da Schalling *et al.* (2002). La tecnica si basa sullo stesso principio della DAT ma utilizza alte concentrazioni di parassita, prevede che il siero venga saggiato ad un'unica diluizione e fornisce i risultati in 3 ore, invece che in 18-20, come nella DAT. Per FAST si è osservata una sensibilità del

93,6% e una specificità del 89,0%; per DAT la sensibilità è stata dell'88,6% e la specificità del 96,7%.

Un diverso protocollo FAST è stato messo a punto recentemente anche da Babakhan *et al.* (2009) che hanno ottenuto valori del 98,6% di sensibilità e del 78,7% di specificità. Come anche già commentato per altre tecniche diagnostiche sierologiche, la DAT e la FAST assicurano buone rese in termini di sensibilità e specificità, ma ciò che manca è una standardizzazione della metodica in riferimento soprattutto all'assunzione di un titolo soglia che sia considerato valido dai laboratori che adottano queste tecniche.

COUNTERIMMUNOELETTROFORESI (CIE)

Si basa sulla diffusione in gel di Ag e Ab, la cui velocità di migrazione è favorita dall'applicazione di una corrente elettrica. L'avvenuta interazione Ag-Ab viene visualizzata attraverso la formazione di archi di precipitazione. Il fatto di non dovere impiegare immunoglobuline anti specie-specifiche, ne permette l'utilizzo per indagini su qualsiasi specie animale. Il vantaggio della metodiche sta nel fatto che è molto rapida e non richiede laboratori attrezzati in modo particolare, aspetto questo che ne favorirebbe l'impiego in studi epidemiologici. Anche i valori di specificità e sensibilità sarebbero favorevoli. Mancianti e Meciani (1988) hanno riportato valori di sensibilità compresi tra 80% e 96,1% saggiando cani a vari stadi della malattia, mentre la specificità è stata del 100% in soggetti sani e del 90,5% in cani affetti da altre patologia. Valori simili sono riportati anche da Maia *et al.* (2007): 85,8% di sensibilità e 94,7% di specificità (Maia e Campino, 2008).

Delle tecniche sierologiche sopra descritte quelli maggiormente utilizzate per la diagnosi di LCan sono sicuramente l'IFI e l'ELISA. L'aspetto che principalmente limita un maggior impiego delle altre è rappresentato dalla mancanza di standardizzazione dei protocolli.

Altri esami indiretti

TEST INTRADERMICO (MONTENEGRO TEST)

E' una prova di ipersensibilità ritardata che mette in evidenza un precedente contatto con il parassita (Otranto, 2009). La prova consiste in un inoculo intradermico di una sospensione inattivata di promastigoti, diluiti in fenolo o in soluzione salina di mertiolato; come controllo, in un sito differente, si inocula il solo diluente. In caso di reazione positiva si osserva un inspessimento di circa 5 mm nel sito di inoculo dopo 48-72 ore (Maia e Campino, 2008). In generale, il test risulta negativo durante la fase attiva della malattia, mentre da esito positivo durante l'infezione subclinica, nei primi stadi della malattia e dopo il trattamento terapeutico (Maia e Campino, 2008).

E' impiegato in indagini epidemiologiche, per valutare la risposta di persone che vivono in zone endemiche e per valutare il grado di circolazione del parassita nella popolazione (Otranto, 2009).

PARTE SPERIMENTALE

COMPARAZIONE DI METODICHE

SIEROLOGICHE

PREMESSA

La parte sperimentale che verrà esposta di seguito riporta i risultati di un confronto tra metodiche diagnostiche sierologiche. Il lavoro è stato svolto in collaborazione tra il Laboratorio di Prova di Sierologia del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale (DSPVPA) dell'Università di Bologna, e il Laboratorio di Parassitologia della Facoltà di Farmacia dell'Università di Barcellona.

MATERIALI E METODI

CAMPIONI IN ESAME

E' stato saggiato in IFI, ELISA e WB un campione di 100 sieri di cane proveniente dalla banca sieri del Laboratorio di Prova di Sierologia. Il saggio in IFI è stato effettuato presso lo stesso laboratorio, mentre i saggi in ELISA e WB sono stati realizzati presso il Laboratorio di Parassitologia della Facoltà di Farmacia dell'Università di Barcellona. I sieri erano stati prelevati da cani residenti in un canile della provincia di Bologna, durante lo svolgimento di attività di monitoraggio inerenti il Progetto regionale per la realizzazione di un Sistema di sorveglianza della leishmaniosi nella regione Emilia-Romagna. La numerosità del campione non è stata stabilita in base a criteri statisticamente definiti e la scelta dei campioni dalla banca sieri da destinare a questa parte sperimentale è stata effettuata random.

IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA

L'IFI è stata eseguita secondo le indicazioni riportate nella SOP MIPAV SIE 10.01.004 (allegato 1). Come antigene sono stati impiegati promastigoti di *L. infantum* del ceppo di riferimento dell' OMS MHOM/TN/80/IPT1, coltivati secondo le modalità indicate nella SOP MIPAV SIE 10.01.001 (allegato 2). I vetrini con l'Ag sono stati allestiti secondo le procedure riportate nella SOP MIPAV SIE 10.01.002 (allegato 3).

Sono state utilizzate immunoglobuline anti-IgG di cane, coniugate con isotiocianato di fluoresceina; la diluizione scelta per l'uso è stata ottenuta tramite titolazione, secondo le procedure indicate dalla SOP MIPAV SIE 10.01.003 (allegato 4).

Per ciascun siero è stata allestita una prova di screening, saggiando le diluizioni 1:40 e 1:80. In caso di positività alla diluizione 1:80 i sieri sono stati sottoposti a diluizioni per raddoppio con lo scopo di determinare il titolo anticorpale.

Ai fini della valutazione dello stato di infezione, gli animali con titolo ≥ 160 sono stati considerati infetti; quelli con titolo 40 e 80 si classificavano come dubbi (Gradoni *et al.*, 2004).

ELISA

La metodica ELISA è stata condotta secondo le modalità indicate da Riera *et al.* (1999).

PREPARAZIONE DELL'AG

L'Ag impiegato nella prova è costituito da promastigoti di *L. infantum* del ceppo di riferimento MHOM/FR/LEM75/MON1, isolato presso il Laboratoire d'Ecologie Médicale et Pathologie Parasitaire (LEM) della Facoltà di Medicina dell'Università di Montpellier (Francia).

Un'aliquota da 1 ml del ceppo di riferimento è stata scongelata e messa in coltura in terreno Schneider al 20% SFB (Siero Fetale Bovino) e mantenuto alla temperatura di 26°C (Taylor, 1987). Dopo quattro giorni di incubazione, osservata una buona vitalità del ceppo al microscopio invertito, è stata allestita 1 fiasca con 40 ml di terreno Schneider al 20% SFB e 10 ml del ceppo, incubata a 26°C. Dopo aver mantenuto la coltura alle stesse condizioni sopra indicate per 4 giorni, la coltura è stata nuovamente esaminata e, osservata una crescita omogenea del ceppo, l'intero volume è stato suddiviso in 5 aliquote da 10 ml in Falcon da 50 ml. Le aliquote sono state centrifugate per 10 min a 2500 rpm a 4 °C.; il surnatante è stato eliminato e il pellet risospeso in 40 ml di *Phosphate Buffered Saline* (PBS) sterile. Dopo 3 lavaggi in PBS, il pellet risultante dall'ultima centrifugazione è stato risospeso in 5 ml di PBS sterile e trasferito in una nuova provetta, che veniva mantenuta refrigerata per effettuare 6 cicli di sonicazione da 30 sec. cadauno. Si è valutata la concentrazione proteica di partenza del ceppo mediante PNT Protein assay Pierce.

Per arrivare alla concentrazione di 1000 µl/ml, nota la concentrazione proteica iniziale, si applicava la formula

$$VC+V'C'=(V+V')C_f$$

dove: V= volume di antigene

C= concentrazione della proteina del ceppo appena valutato

V'= volume di PBS che bisogna aggiungere

C'= concentrazione di Ag presente nel PBS (sarà sempre 0)

C_f= concentrazione finale uguale a 1000 µl/ml

Una volta adeguatamente diluito il campione fino alla concentrazione desiderata, questo è stato suddiviso in aliquote da 1 ml in eppendorf da 1,5 ml e conservato a -20°C fino all'utilizzo.

SENSIBILIZZAZIONE DELLE PIASTRE

Un'aliquota dell'Ag così ottenuto è stata utilizzata per la sensibilizzazione di un adeguato numero di piastre da microtitolazione.

L'Ag è stato scongelato e diluito in 48 ml di Tampone Carbonato-Bicarbonato 0,1, pH 9,6. Dopo aver dispensato 100 µl di Ag per pozzetto, le piastre da microtitolazione sono state quindi avvolte in carta d'alluminio e tenute per una notte a 4°C. Trascorso questo tempo, la soluzione in eccesso è stata eliminata da ciascun pozzetto e sono stati aggiunti 200 µl di PBS all'1% di latte parzialmente scremato, allo scopo di favorire l'adesione dell'Ag sul fondo del pozzetto e coprire gli eventuali punti dove i promastigoti non avessero aderito. E' seguita un'incubazione di 1h a 37 °C, e successivamente 3 lavaggi da 5 min cadauno in Soluzione Salina Tween (TS-T) e un ultimo in Soluzione Salina 0,9‰ pH 7,2. (TS). Le piastre sono state quindi depositate capovolte su carta assorbente e lasciate asciugare; sono state stoccate a -20 °C.

ELISA

I sieri in esami sono stati saggiati alle diluizioni 1:200 e 1:400.

In ogni saggio sono stati inseriti 1 controllo positivo (K+; siero di cane positivo per leishmaniosi), 1 controllo negativo (K-; siero di coniglio negativo per leishmaniosi), 1 siero calibratore, 1 controllo bianco e 1 controllo del coniugato.

Sono state allestite diluizioni per raddoppio direttamente in piastra impiegando PBS-Tween-Latte 1% (PBS-T-L 1%), partendo dalla diluizione 1:100; nel pozzetto destinato al controllo del coniugato, il siero è stato sostituito da PBS-T-L 1%.

Dopo incubazione per 1 ora su piano oscillante a 37°C in camera umida, sono stati eseguiti 3 lavaggi di 5 min ciascuno in TS-T mediante la macchina AM60 Multi.Reagent Washer (Dynex Technologies) e un ultimo con TS. Le piastre sono state quindi asciugate con cura. In ciascun pozzetto è stato quindi dispensato il coniugato, consistente in 100 µl di Proteina A perossidasi (SIGMA), utilizzato alla diluizione 1:30000; nei pozzetti allestiti per il controllo bianco il coniugato è stato sostituito con 100 µl di PBS-T-L 1%. Dopo una seconda incubazione a temperatura ambiente per 1 ora in camera umida e in costante agitazione, sono stati ripetuti i lavaggi nelle stesse condizioni descritte precedentemente.

Si è proceduto quindi con l'aggiunta del substrato Sigma Fast™ OPD-Sigma (O-phenylendiamine). La piastra da microtitolazione è stata mantenuta in agitazione costante fino a quando il substrato aggiunto non ha raggiunto una colorazione giallo oro, ed effettuando una lettura allo spettrofotometro (Titertek Multiskan® Plus-MKII), con un filtro a 450 nm, si è ottenuto un valore di 0,450. La reazione del substrato è stata quindi bloccata aggiungendo in ciascun pozzetto 50 µl di H₂SO₄. Si è proceduto alla lettura allo spettrofotometro a 492 nm.

Sono stati considerati positivi i sieri che riportavano valore di densità ottica ≥ 20.

WESTERNBLOT

Il Western Blot è stato eseguito secondo le indicazioni riportate da Aisa *et al.* (1998) e da Riera *et al.* (1999)

PREPARAZIONE DELL'AG

L'Ag per la reazione di WB consisteva in promastigoti di *L. infantum* del ceppo di riferimento MHOM/FR/LEM75/MON1.

Un'aliquota del ceppo è stata scongelata e messa in coltura secondo le modalità già illustrate per la preparazione dell'Ag per ELISA.

A tre giorni dalla messa in coltura, dopo aver osservato un'adeguata crescita del ceppo, sono state allestite 7 subcolture contenenti ciascuna 50 ml di terreno Schneider al 20% SFB e 1 ml di coltura parassitaria.

Le colture sono state osservate al microscopio invertito e si è proceduto con il conteggio per avere una stima della concentrazione di partenza del ceppo. Applicando la formula

$$N^{\circ} \text{ cel/ml} = n * K$$

dove: n= numero di parassiti contati in ogni riquadro piccolo

K=8000, costante che tiene in conto il quantitativo di terreno distribuito in ogni riquadro grande (0,0125),

è stato ottenuto il numero di parassiti presenti nel terreno di partenza.

Tramite la formula $VC + V'C' = (V + V') * C_f$, già precedentemente illustrata, è stato ottenuto il volume di terreno contenente la concentrazione desiderata di promastigoti, pari a 300×10^6 promastigoti/ml.

La coltura, trasferita in provette Falcon sterili, è stata sottoposta a una centrifugazione a 2500 rpm per 10 min a 4°C. Sono stati quindi effettuati 3 lavaggi con 40, 30 e 20 ml di PBS rispettivamente, alle stesse condizioni prima descritte.

Dopo l'ultimo lavaggio è stato eliminato il surnatante, e si è proceduto con l'omogeneizzazione del pellet, con un quantitativo minimo di PBS. Il pellet così omogenato è stato trasferito in una provetta Falcon sterile e, in base al calcolo prima effettuato, è stato diluito l'Ag con un tampone 0.5M Tris-HCl, pH 6,8, 0,01M EDTA, 5% sodium dodecyl sulfate [SDS], 5% 2-mercaptoetanol, 0,0125%. Blu di nBromoferolo, che permetteva anche la visualizzazione della successiva corsa elettroforetica.

L'Ag così preparato è stato suddiviso in aliquote da 350 µl in eppendorf da 1,5 ml e conservato a -20°C fino al suo utilizzo.

SDS-POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS (SDS-PAGE)

Le frazioni proteiche dell'Ag sono state separate in base al loro peso molecolare tramite corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide al 12%, mediante Mini Trans Blot cell (Bio Rad).

Si è proceduto con la preparazione dello *stacking* gel 4% e del *resolving* gel 12%: il primo ha avuto il ruolo di compattare le frazioni proteiche per permettere una migrazione omogenea nel *resolving* gel.

Una volta avvenuta la polimerizzazione dei gels, sono stati caricati 150 µl dell'Ag precedentemente preparato e 5 µl del marker Standard Low range (Bio Rad). L'apparato è stato collegato a una fonte elettrica con voltaggio impostato a 50 V fino a quando non si è osservato il passaggio dell'Ag dallo *stacking* gel al *resolving* gel; a questo punto il voltaggio è stato portato a 100V per circa 2 ore. La corsa è stata favorita dalla presenza di un Buffer di corsa 1X.

TRASFERIMENTO SU MEMBRANA

Terminata la corsa elettroforetica, si è proceduto con il trasferimento delle frazioni antigeniche separate su foglio di nitrocellulosa.

Il gel è stato messo a diretto contatto con il foglio di nitrocellulosa sul quale sarebbe avvenuto il trasferimento e il tutto è stato sistemato tra due fogli di carta assorbente e 2 spugne, a costituire un "sandwich". La cella di trasferimento Mini Trans Blot cell (Bio Rad) è stata riempita con il Buffer di trasferimento TRIS 0,025M, glicina 0,192M, metanolo 20% pH 8.4 ed è stato applicato un campo elettrico ad un voltaggio di 100 V e un amperaggio non superiore a 340 mA , per 1 ora; il trasferimento è avvenuto ad una temperatura di 4°C. La nitrocellulosa così sensibilizzata è stata mantenuta a 4°C per 12 ore in un tampone salino TRIS-5 % di latte scremato (TS-L 5%), per il fissaggio delle componenti proteiche.

Trascorso questo tempo, il tampone in eccesso è stato eliminato ed è stato fatto 1 lavaggio rapido e 3 da 10 min cadauno in Tampone Tris salino 20 mM 1X (TS 1X 20 mM), in costante agitazione.

I fogli di nitrocellulosa così sensibilizzati sono stati avvolti in carta di alluminio e conservati a -20°C.

IMMUNOBLOTTING

La nitrocellulosa è stata tenuta per 5 min a temperatura ambiente in 50 ml di TS 1X. Con un bisturi sono state quindi tagliate delle strisce di nitrocellulosa dello spessore di circa 2 mm che sarebbero state poste nel *Multiscreen Apparatus* (BIO RAD); ciascuna striscia è stata identificata con il numero corrispondente al siero in esame.

I sieri sono stati saggiati alla diluizione 1:50, cosicché nei singoli canali del *multiscreen* sono stati dispensati 490 µl di TS-Tween-latte 1% (TS-T-L 1%) e 10 µl di siero in esame. In ogni prova è stato inserito anche 1 controllo positivo, che è stato processato alla stessa maniera, costituito dal siero di un cane risultato positivo in ELISA e WB.

I sieri così diluiti sono stati incubati per 1h a 37°C in camera umida e mantenuti in costante oscillazione (75 rpm) su Rotative Shaker (Atom 85).

Sono seguiti 3 lavaggi da 5 min cadauno in 1 ml circa di TS-T; un ultimo lavaggio è stato effettuato per 5 min in 1 ml di TS 1X; durante i lavaggi la *multiscreen* è stata tenuta a temperatura ambiente e in costante agitazione (150 rpm).

Si è realizzata quindi l'incubazione con il coniugato, costituito da proteina A perossidasi (PAPO Pierce), impiegato alla diluizione 1:1000 in TS-T-L 1%: in ciascun canale sono stati dispensati 500 µl del coniugato diluito e si è proceduto con una incubazione a temperatura ambiente per 1h in costante agitazione (150 rpm). La soluzione in eccesso è stata eliminata e le strisce di nitrocellulosa sono state lavate con 3 lavaggi da 5 min cadauno, eseguiti secondo le modalità sopraindicate, a cui ha fatto seguito un ultimo lavaggio da 5 min in TS 500mM 1X. Le strisce sono state quindi trasferite in un apposito contenitore con il substrato rivelatore costituito da 1.3 ml di 4-cloro-1-naftolmentanolo 0.3 %, 20 ml di TS 500mM 1% e 10 µl di H₂O₂. La reazione enzimatica è stata favorita mantenendo le strisce di nitrocellulosa in stufa a

37°C per circa 15 min. La reazione è stata considerata realizzata nel momento in cui il controllo positivo restituiva una colorazione blu di intensità adeguata; a questo punto la reazione veniva bloccata aggiungendo acqua di fonte. Le strisce sono state fatte asciugare su carta assorbente e sono state osservate in un secondo momento. Il peso molecolare, espresso in kDa, è stato determinato confrontando la mobilità elettroforetica delle bande con quella dello Standard Low range (Bio Rad), che è stato sottoposto simultaneamente alle stesse condizioni elettroforetiche.

Sono stati considerati positivi i campioni per i quali si è potuto apprezzare la presenza di almeno una delle bande di 14 e 12 kDa (Aisa *et al.*, 1998; Riera *et al.*, 1999).

Elaborazione statistica dei dati

I risultati ottenuti con le tre metodiche sierologiche sono stati analizzati congiuntamente al fine di calcolare il grado di concordanza tra le metodiche, misurato considerando un intervallo di confidenza del 95%. Per ciascuna tecnica è stato calcolato il grado di concordanza generale (*overall agreement*). I valori di concordanza positiva (*positive agreement*) e concordanza negativa (*negative agreement*) calcolati sono stati interpretati come sensibilità e specificità relativi, in base allo schema riportato di seguito (Armitage, 1971).

		GOLD STANDARD		
		+	–	
ELISA/WB	+	A	B	A+B
	–	C	D	C+D
		A+C	B+D	N

$$\text{Positive agreement} = (a/a+c) \cdot 100$$

$$\text{Negative agreement} = (d/b+d) \cdot 100$$

Per misurare il grado di concordanza tra ELISA/WB e il *gold standard* sono state seguite le indicazioni di Martin *et al.* (1987). La probabilità che ciascun test risultasse positivo è stata assunta pari alla prevalenza apparente ($n^{\circ} \text{al test} / n^{\circ}$

tot esaminati). Conseguentemente, la probabilità che ciascun test risultasse negativo è stata assunta pari a 1-prevalenza apparente. La probabilità che entrambe le tecniche a confronto fossero positive è stato dato dal prodotto delle due prevalenze apparenti ($p_1 \cdot p_2$); analogamente, la probabilità che entrambe le metodiche risultassero negative è stato dato dal prodotto delle due prevalenze apparenti $[(1-p_1) \cdot (1-p_2)]$. Per ciascuna coppia di test è stato quindi calcolato il valore di *agreement* casuale, sommando i valori di probabilità positiva e negativa, ottenuti come sopra riportato. La differenza tra il valore di *overall agreement* e *agreement* casuale è stata interpretata come la concordanza non dovuta al caso. Questa differenza, rapportata al suo valore massimo (1-*overall agreement*) ha permesso di ottenere il valore di K, assunto come indicatore relativo di quanto *overall agreement* sia superiore a *agreement* casuale.

ELISA/WB		GOLD STANDARD		TOTALE
		+	-	
	+	A	B	A+B
	-	C	D	C+D
		A+C	B+D	N

OVERALL AGREEMENT	$(A+D)/N$
PREVALENZA DI POSITIVI CON IFI (p_1)	$(A+C)/N$
PREVALENZA DI NEGATIVI CON IFI ($1-p_1$)	1-PREV. POSITIVI IFI
PREVALENZA DI POSITIVI CON ELISA/WB (p_2)	$(A+B)/N$
PREVALENZA DI NEGATIVI CON ELISA/WB ($1-p_2$)	1-PREV. POSITIVI ELISA/WB
PROBABILITÀ. ESITO + CON ENTRAMBE LE METODICHE	$(p_1 \cdot p_2)$
PROBABILITÀ. ESITO - CON ENTRAMBE LE METODICHE	$[(1-p_1) \cdot (1-p_2)]$
AGREEMENT CASUALE	$(p_1 \cdot p_2) + [(1-p_1) \cdot (1-p_2)]$
AGREEMENT RESIDUO	OVERALL AGREEMENT-AGREEMENT CASUALE
AGREEMENT MASSIMO	1-AGREEMENT CASUALE
K	AGREEMENT RESIDUO/AGREEMENT MASSIMO

Tabella 11: calcolo di *overall agreement*, p_1 , $(1-p_1)$, p_2 , $(1-p_2)$,

RISULTATI

Nelle tabelle riportate di seguito sono schematizzati i risultati ottenuti analizzando i 100 sieri di cane in IFI, ELISA e Western Blot.

Relativamente ai risultati ottenuti con l'IFI, considerando positivi i sieri con titolo anticorpale ≥ 40 , indicativo di un contatto con il parassita, si ottiene una prevalenza complessiva del 37%. I risultati ottenuti in WB indicano una prevalenza del 14%, uguale a quella osservata in ELISA prendendo come soglia di positività il titolo 1:400. La prevalenza ottenuta in ELISA è invece del 26%, se si considera come soglia il titolo 1:200.

Come schematizzato nella Tabella 12 in IFI, 63 dei 100 sieri in esame sono risultati negativi, 37 hanno presentato titoli variabili da 40 a 320.

	IFI
NEG	63
1:40	23
1:80	8
1:160	5
1:320	1

Tabella 12: Risultati della prova di IFI

In ELISA, sono stati osservati risultati differenti a seconda della diluizioni alla quale i campioni sono stati saggiati. Quando testati alla diluizione 1:200, sono stati osservati 26 positivi e 74 negativi; alla diluizione 1:400 invece 14 campioni sono risultati positivi e 86 negativi (Tabella 13).

	ELISA 1:200	ELISA 1:400
POSITIVI	26	14
NEGATIVI	74	86

Tabella 13: Risultati dalla reazione ELISA

Il Western Blot ha evidenziato 14 positivi e 86 negativi (Tabella 14).

	WB
POSITIVI	14
NEGATIVI	86

Tabella 14: Risultati dal saggio in Western Blot

IFI vs ELISA

Dal confronto dei risultati ottenuti in IFI con quelli osservati in ELISA 1:200 (Tabella 15) si è osservato che dei 63 sieri che erano risultati negativi in IFI, 54 hanno dato esito negativo anche in ELISA, mentre per 9 campioni è stata osservata positività al saggio immunoenzimatico. Dei 23 sieri con titolo 40 in IFI, 18 sono risultati negativi in ELISA e per 5 è stato osservato esito positivo.

Degli 8 con titolo anticorpale in IFI pari a 80, 2 sono risultati negativi in ELISA, e 6 positivi.

I 6 con titolo IFI ≥ 160 sono risultati positivi in ELISA.

IFI	ELISA 1:200 NEGATIVI	ELISA 1:200 POSITIVI	TOTALE
NEGATIVI	54	9	63
40	18	5	23
80	2	6	8
160	0	5	5
320	0	1	1
TOTALE	74	26	100

Tabella 15: Risultati IFI vs ELISA 1:200

Il raffronto IFI/ELISA 1:400 ha dato esiti differenti (Tabella 16).

Dei 63 sieri negativi in IFI, 60 sono risultati negativi anche in ELISA mentre per 3 è stata registrata positività. Dei 23 sieri che hanno riportato titolo 40 in IFI, 21

sono risultati negativi in ELISA. 5 degli 8 campioni positivi alla diluizione 1:80 in IFI sono risultati positivi anche in ELISA; 3 hanno fornito esito negativo.

I 6 sieri con titolo anticorpale ≥ 160 hanno dato esito positivo anche in ELISA.

IFI	ELISA 1:400 NEGATIVI	ELISA 1:400 POSITIVI	TOTALE
NEGATIVI	60	3	63
40	21	2	23
80	5	3	8
160	0	5	5
320	0	1	1
TOTALE	86	14	100

Tabella 16: Risultati IFI vs ELISA 1:400

IFI vs WB

I risultati del confronto tra i dati osservati in IFI e quelli riportati in WB sono schematizzati nella Tabella 17

Dei 63 sieri risultati negativi in IFI, 58 hanno fornito esito negativo anche in WB e 5 sono risultati positivi. Dei 23 campioni per i quali era stato ottenuto in IFI titolo 40, 21 sono risultati negativi in WB e per 2 è stato possibile apprezzare la presenza di almeno una delle due bande di interesse diagnostico. Per 3 degli 8 campioni che hanno riportato titolo 80, è stata confermata la positività anche con il WB, mentre per 5 campioni non si è avuto ugual esito. Dei 6 campioni con titolo ≥ 160 , 4 sono risultati positivi in WB, mentre 2 hanno dato esito negativo.

IFI	WB NEGATIVI	WB POSITIVI	TOTALE
NEGATIVI	58	5	63
40	21	2	23
80	5	3	8
160	2	3	5
320	0	1	1
TOTALE	86	14	100

Tabella 17: Risultati IFI vs WB

ELABORAZIONE DEI DATI

I risultati ottenuti in ELISA 1:200, ELISA 1:400 e WB sono stati confrontati con quelli riportati in IFI, considerata tecnica di riferimento secondo quanto indicato dall'OIE (2008), al fine di calcolare la percentuale di concordanza, considerando un intervallo di confidenza del 95%.

Nell'analisi statistica dei dati ottenuti dalle tre metodiche sono state considerate 3 classi di risultati, in riferimento a quanto osservato in IFI: nella prima sono stati inseriti i campioni che hanno presentato positività o negatività alla diluizione soglia 1:40; la seconda era costituita dai sieri che hanno riportato in IFI titoli 40 e 80, la terza formata dai campioni risultati positivi in IFI alle diluizioni $\geq 1:160$.

IFI 40, ELISA 1:200 ed ELISA 1:400

Nella Tabella 18 sono riportati i valori di concordanza osservati con l'ELISA 1:200. Il valore di concordanza generale tra ELISA 1:200 e IFI 1:40 è risultato essere di $0,71 \pm 0,009$ ($71\% \pm 0,9\%$); considerando i casi per i quali entrambe le prove hanno dato esito negativo, il grado di concordanza è $0,86 \pm 0,0109$ ($86\% \pm 1,009\%$); il valore scende a $0,46 \pm 0,0264$ ($46\% \pm 2,64\%$) se si tengono in considerazione solo i campioni che sono risultati positivi con entrambe le metodiche.

ELISA 1:200	IFI 40		TOTALE
	NEGATIVI	POSITIVI	
NEGATIVI	54	20	74
POSITIVI	9	17	26
TOTALE	63	37	100
OVERALL AGREEMENT	$0,71 \pm 0,009$ ($71\% \pm 0,9\%$)		
NEGATIVE AGREEMENT	$0,86 \pm 0,0109$ ($86\% \pm 1,09\%$)		
POSITIVE AGREEMENT	$0,46 \pm 0,0264$ ($46\% \pm 2,64\%$)		

Tabella 18: Valori di concordanza IFI 40 vs ELISA 1:200 con intervallo di confidenza del 95%

Confrontando questi dati, è stato osservato un valore di prevalenza del 26% per ELISA 1:200 e del 37% per IFI 1:40. La probabilità che entrambe le metodiche dessero esito positivo (probabilità ++) è stata del 9,62%; un valore più basso è stato trovato relativamente alla probabilità che entrambi i test dessero esito negativo (probabilità --) (4,66%). L'*agreement* casuale è stato del 56,2% e lo scostamento dall'*overall agreement* del 14,7%. Il valore di *agreement* massimo riscontrabile per questi dati è stato calcolato pari al 43,7%; il 33,7% della concordanza non è dovuta al caso (K) (Tabella 19).

	PREVALENZA	1-PREVALENZA
IFI 40	0,37 (37%)	0,63 (63%)
ELISA 1:200	0,26 (26%)	0,74 (74%)
PROBABILITÀ(++);(--)	0,0962 (9,62%)	0,4662 (4,66%)
AGREEMENT CASUALE	0,562 (56,2%)	
AGREEMENT RESIDUO	0,147 (14,7%)	
AGREEMENT MASSIMO	0,437 (43,7%)	
K	0,337 (33,7%)	

Tabella 19: valori di prevalenza, probabilità (++), probabilità (--), *agreement* casuale, *agreement* residuo, *agreement* massimo e K per IFI 40 vs ELISA 1:200.

Nella Tabella 20 si esamina il grado di concordanza tra IFI 40 ed ELISA 1:400. Il grado di concordanza generale è uguale a quella osservata per il confronto ELISA 1:200/IFI 40, ma il valore sale al 95% quando si considerano i campioni con esito negativo ad entrambe le tecniche, mentre la concordanza per i risultati positivi scende al 30%.

ELISA 1:400	IFI 40		TOTALE
	NEGATIVI	POSITIVI	
NEGATIVI	60	26	86
POSITIVI	3	11	14
TOTALE	63	37	100
OVERALL AGREEMENT	0,71± 0,009 (71%± 0,9%)		
NEGATIVE AGREEMENT	0,95± 0,007 (95%± 0,7%)		
POSITIVE AGREEMENT	0,30± 0,0242 (30%± 2,42%)		

Tabella 20: Valori di concordanza IFI 40 vs ELISA 1:400 con intervallo di confidenza del 95%

La prevalenza per ELISA 1:400 è stata del 14%, mentre quella per IFI 40 è stata del 37%. La probabilità che sia ELISA 1:400 sia IFI 1:40 risultassero positive è stata del 5,2%, mentre quella che entrambe dessero esito negativo è stato del 5,42%. L'*agreement* casuale è stato trovato pari al 59,4%, con uno scostamento da *overall agreement* del 11,6%. Il valore di *agreement* massimo osservabile è stato misurato pari al 40,6%. Il valore di K è del 40,6% (Tabella 21).

	PREVALENZA	1-PREVALENZA
IFI 40	0,37 (37%)	0,63 (63%)
ELISA 400	0,14 (14%)	0,86 (86%)
PROBABILITÀ(++);(--)	0,052 (5,2%)	0,542 (5,42%)
AGREEMENT CASUALE	0,594 (59,4%)	
AGREEMENT RESIDUO	0,116 (11,6%)	
AGREEMENT MASSIMO	0,406 (40,6%)	
K	0,286 (28,6%)	

Tabella 21: Valori di prevalenza, probabilità (++), probabilità (--), *agreement* casuale, *agreement* residuo, *agreement* massimo e K per IFI 40 vs ELISA 1:400.

IFI 40 vs WB

Il WB ha mostrato una concordanza generale di 0,67± 0,009 (67%± 0,9%) con il *gold standard*. Valutando nello specifico la concordanza sui campioni negativi e

i positivi con entrambe le tecniche, si sono osservati i valori $0,92 \pm 0,008$ ($92\% \pm 0,8\%$) e $0,24 \pm 0,0227$ ($24\% \pm 22,7\%$), rispettivamente (Tabella 22).

WB	IFI 40		TOTALE
	NEGATIVI	POSITIVI	
NEGATIVI	58	28	86
POSITIVI	5	9	14
TOTALE	63	37	100
OVERALL AGREEMENT	$0,67 \pm 0,009$ ($67\% \pm 0,9\%$)		
NEGATIVE AGREEMENT	$0,92 \pm 0,008$ ($92\% \pm 0,8\%$)		
POSITIVE AGREEMENT	$0,24 \pm 0,0227$ ($24\% \pm 22,7\%$)		

Tabella 22: Valori di concordanza tra IFI 40 vs WB con intervallo di confidenza del 95%

I valori di prevalenze, probabilità, *agreement* casuale, *agreement* residuo, *agreement* massimo e K sono riportati nella Tabella 23.

	PREVALENZA	1-PREVALENZA
IFI 40+	0,37 (37%)	0,63 (63%)
WB	0,14 (14%)	0,86 (86%)
PROBABILITÀ(++);(--)	0,052 (5,2%)	0,542 (5,4%)
AGREEMENT CASUALE	0,594 (59,4%)	
AGREEMENT RESIDUO	0,076 (7,6%)	
AGREEMENT MASSIMO	0,406 (40,6%)	
K	0,188 (18,8%)	

Tabella 23: Valori di prevalenza, probabilità (++), probabilità (--), *agreement* casuale, *agreement* residuo, *agreement* massimo e K per IFI 40 vs WB.

IFI 40-80, ELISA 1:200 ed ELISA 1:400

Nella Tabella 24 sono indicati i valori di concordanza osservati tra IFI 40-80 ed ELISA 1:200. Il valore di concordanza generale è risultato essere di $0,69 \pm 0,009$ ($69\% \pm 0,9\%$); considerando i casi per i quali entrambe le prove hanno dato esito negativo, il grado di concordanza è stato $0,86 \pm 0,0109$ ($86\% \pm 1,09\%$); il valore è sceso a $0,35 \pm 0,03$ ($35\% \pm 3\%$) tenendo in considerazione solo i campioni risultati positivi con entrambe le metodiche.

ELISA 1:200	IFI 40-80		TOTALE
	NEGATIVI	POSITIVI	
NEGATIVI	54	20	74
POSITIVI	9	11	20
TOTALE	63	31	94
OVERALL AGREEMENT	0,69± 0,009 (69%± 0,9%)		
NEGATIVE AGREEMENT	0,86± 0,0109 (86%± 1,09%)		
POSITIVE AGREEMENT	0,35± 0,03 (35%± 3%)		

Tabella 24: Valori di concordanza IFI 40-80 vs ELISA 1:200 con intervallo di confidenza del 95%

Come si può osservare dai dati riportati nella Tabella 25, si è osservata una prevalenza del 21,3% per ELISA 1:200 a fronte del 32,9% per IFI 40-80. Il valore di probabilità (++) trovato è stato del 7%, contro il 52,7% calcolato per la probabilità (--). I dati ottenuti hanno permesso di calcolare l'*agreement* casuale pari al 59,7%, con uno scostamento da *overall agreement* del 9,3% (*agreement* residuo). Il valore massimo di concordanza per i risultati ottenuti è del 40,2%. Il 23,3% della concordanza osservata non è dovuta al caso.

	PREVALENZA	1-PREVALENZA
IFI 40-80	0,329 (32,9%)	0,670 (67%)
ELISA 1:200	0,213 (21,3%)	0,787 (78,7%)
PROBABILITÀ(++);(--)	0,070 (7%)	0,527 (52,7%)
AGREEMENT CASUALE	0,597 (59,7%)	
AGREEMENT RESIDUO	0,093 (9,3%)	
AGREEMENT MASSIMO	0,402 (40,2%)	
K	0,233 (23,3%)	

Tabella 25: Valori di prevalenza, probabilità (++), probabilità (--), *agreement* casuale, *agreement* residuo, *agreement* massimo e K per IFI 40-80 vs ELISA 1:200.

Nella Tabella 26 si esamina il grado di concordanza tra IFI 40-80 ed ELISA 1:400. Il grado di concordanza generale è uguale a quello riportato per il confronto IFI 40-80/ELISA 1:200 (69%± 0,9%), il valore sale a 0,95± 0,007 (95%± 0,7%) quando si considerano i campioni con esito negativo ad entrambe

le tecniche, mentre la concordanza per i risultati positivi ad entrambe le tecniche è dello $0,16 \pm 0,0232$ ($16\% \pm 2,32\%$).

ELISA 1:400	IFI 40-80		TOTALE
	NEGATIVI	POSITIVI	
NEGATIVI	60	26	86
POSITIVI	3	5	8
TOTALE	63	31	94
<i>OVERALL AGREEMENT</i>	$0,69 \pm 0,009$ ($69\% \pm 0,9\%$)		
<i>NEGATIVE AGREEMENT</i>	$0,95 \pm 0,007$ ($95\% \pm 0,7\%$)		
<i>POSITIVE AGREEMENT</i>	$0,16 \pm 0,0232$ ($16\% \pm 2,32\%$)		

Tabella 26: Valori di concordanza IFI 40-80 vs ELISA 1:400 con intervallo di confidenza del 95%

Dal confronto IFI 40-80/ELISA 1:400 è stata calcolata una prevalenza dell'8,5% per ELISA 1:400 e del 32,9% per IFI 40-80. La probabilità (++) misurata è stata del 2,8% a fronte di una percentuale del 61,3% per la probabilità (--). È stato calcolato un *agreement* casuale del 64,1% con uno scarto del 5% rispetto all'*overall agreement*. La concordanza massima osservabile è stata del 35,8% e il valore di K calcolato pari al 14% (Tabella 27).

	PREV	1-PREV
IFI 40-80	$0,329$ ($32,9\%$)	$0,670$ (67%)
ELISA 1:400	$0,085$ ($8,5\%$)	$0,915$ ($91,5\%$)
PROBABILITÀ(++);(--)	$0,028$ ($2,8\%$)	$0,613$ ($61,3\%$)
<i>AGREEMENT CASUALE</i>	$0,641$ ($64,1\%$)	
<i>AGREEMENT RESIDUO</i>	$0,050$ (5%)	
<i>AGREEMENT MASSIMO</i>	$0,358$ ($35,8\%$)	
K	$0,140$ (14%)	

Tabella 27: Valori di prevalenza, probabilità (++) , probabilità (--), *agreement* casuale, *agreement* residuo, *agreement* massimo e K per IFI 40-80 vs ELISA 1:400.

IFI 40-80 vs WB

Il WB ha mostrato una concordanza generale di $0,67 \pm 0,009$ ($67\% \pm 0,9\%$) con il *gold standard*. Valutando la concordanza sui campioni negativi e i positivi con entrambe le tecniche, si sono osservati i valori $0,92 \pm 0,008$ ($92\% \pm 0,8\%$) e $0,16 \pm 0,0232$ ($16\% \pm 2,32\%$), rispettivamente (Tabella 28).

WB	IFI 40-80		TOTALE
	NEGATIVI	POSITIVI	
NEGATIVI	58	26	84
POSITIVI	5	5	10
TOTALE	63	31	94
OVERALL AGREEMENT	$0,67 \pm 0,009$ ($67\% \pm 0,9\%$)		
NEGATIVE AGREEMENT	$0,92 \pm 0,008$ ($92\% \pm 0,8\%$)		
POSITIVE AGREEMENT	$0,16 \pm 0,0232$ ($16\% \pm 2,32\%$)		

Tabella 28: Valori di concordanza IFI 40 vs 80 e WB con intervallo di confidenza del 95%

Le prevalenze per IFI 40-80 e WB sono state rispettivamente del 32,9% e del 10,6%. La probabilità (++) è stata del 3,5%, mentre la percentuale di probabilità (–) del 59,9%. La concordanza dovuta al caso è stata calcolata pari al 63,4% che, rispetto all'*overall agreement*, è del 28,6% più bassa. È stato calcolato un *agreement* massimo del 36,6% e K pari al 78,3% (Tabella 29).

	PREV	1-PREV
IFI 40-80	0,329 (32,9%)	0,670 (67%)
WB	0,106 (10,6%)	0,893 (89,3%)
PROBABILITÀ(++);(--)	0,035 (3,5%)	0,599 (59,9%)
AGREEMENT CASUALE	0,634 (63,4%)	
AGREEMENT RESIDUO	0,286 (28,6%)	
AGREEMENT MASSIMO	0,366 (36,6%)	
K	0,783 (78,3%)	

Tabella 29: Valori di prevalenza, probabilità (++), probabilità (--), *agreement* casuale, *agreement* residuo, *agreement* massimo e K per IFI 40-80 vs WB.

IFI ≥160, ELISA 1:200 ed ELISA 1:400

Considerando i campioni che in IFI hanno dato un risultato ≥ 160 , la concordanza generale con ELISA 1:200 è stata dell'80% \pm 0.8%; il valore è salito al 100% effettuando il raffronto con i soli campioni che hanno dato esito positivo con entrambe le tecniche, ed è stato del 79% \pm 0.8% valutando i campioni risultati negativi sia in IFI che in ELISA 1:200. (Tabella 30)

ELISA 1:200	IFI ≥ 160		TOTALE
	NEGATIVI	POSITIVI	
NEGATIVI	74	0	74
POSITIVI	20	6	26
TOTALE	94	6	100
OVERALL AGREEMENT	0,8 \pm 0,008 (80%\pm 0,8%)		
NEGATIVE AGREEMENT	0,79 \pm 0,008 (79%\pm 0,8%)		
POSITIVE AGREEMENT	1 \pm 0 (100%)		

Tabella 30: Valori di concordanza IFI ≥ 160 vs ELISA 1:200 con intervallo di confidenza del 95%

Per IFI ≥ 160 ed ELISA 1:200 sono stati accertati valori di prevalenza del 6% e del 26%, rispettivamente. La probabilità (++) osservata è stata del 1,6%, mentre la percentuale per la probabilità (--) è stata del 69,5%. In base ai risultati ottenuti l'*agreement* casuale è stato stimato pari al 1,1%, l'*agreement* residuo è stato pari al 78,9%, l'*agreement* massimo del 98,9% e il valore di K pari al 79,8% (Tabella 31).

	PREVALENZA	1-PREVALENZA
IFI ≥ 160	0,06 (6%)	0,94 (94%)
ELISA1:200	0,26 (26%)	0,74 (74%)
PROBABILITÀ(++);(--)	0,016 (1,6%)	0,695 (69,5%)
AGREEMENT CASUALE	0,011 (1,1%)	
AGREEMENT RESIDUO	0,789 (78,9%)	
AGREEMENT MASSIMO	0,989 (98,9%)	
K	0,798 (79,8%)	

Tabella 31: Valori di prevalenza, probabilità (++) , probabilità (--), *agreement* casuale, *agreement* residuo, *agreement* massimo e K per IFI ≥ 160 vs ELISA 1:200.

La percentuale di concordanza generale tra IFI ≥ 160 ed ELISA 1:400 è stata del $92\% \pm 0,5\%$. In riferimento ai campioni risultati positivi con entrambe le metodiche, la percentuale di concordanza è stata del 100%; considerando quelli che sono risultati negativi, la concordanza è stata del $91\% \pm 0,6\%$ (Tabella 32).

ELISA1:400	IFI ≥ 160		TOTALE
	NEGATIVI	POSITIVI	
NEGATIVI	86	0	86
POSITIVI	8	6	14
TOTALE	94	6	100
OVERALL AGREEMENT	0,92 \pm 0,005 (92%\pm 0,5%)		
NEGATIVE AGREEMENT	0,914894 \pm 0,006 (91%\pm 0,6%)		
	1 \pm 0 (100%)		

Tabella 32: Valori di concordanza IFI ≥ 160 vs ELISA 1:400 con intervallo di confidenza del 95%

È stata osservata una prevalenza del 6% per l'IFI e del 14% per l'ELISA. I valori di probabilità (++) e probabilità (--) osservati sono stati 0,8% e 80,8%, rispettivamente. È stato misurato un *agreement* casuale dello 0,7%, un *agreement* residuo del 91,3%, un valore di *agreement* massimo pari al 99,3% e un valore di K del 91,9% (Tabella 33).

	PREVALENZA	1-PREVALENZA
IFI ≥ 160	0,06 (6%)	0,94 (94%)
ELISA1:400	0,14 (14%)	0,86 (86%)
PROBABILITÀ(++);(--)	0,008 (0,8%)	0,808 (80,8%)
AGREEMENT CASUALE	0,007 (0,7%)	
AGREEMENT RESIDUO	0,913 (91,3%)	
AGREEMENT MASSIMO	0,993 (99,3%)	
K	0,919 (91,9%)	

Tabella 33: Valori di prevalenza, probabilità (++) , probabilità (--), *agreement* casuale, *agreement* residuo, *agreement* massimo e K per IFI ≥ 160 vs ELISA 1:400.

IFI 160 vs WB

Per i campioni che in IFI hanno riportato titolo anticorpali ≥ 160 , è stata osservata concordanza dei risultati nell'88% \pm 0.6% dei casi. Più specificatamente: nell'89% \pm 0.6% si è riscontrata concordanza dei casi negativi, la percentuale è scesa al 67% \pm 15.4% per i campioni che hanno dato esito positivo con entrambe le tecniche (Tabella 34).

WB	IFI ≥ 160		TOTALE
	NEGATIVI	POSITIVI	
NEGATIVI	84	2	86
POSITIVI	10	4	14
TOTALE	94	6	100
OVERALL AGREEMENT	0,88 \pm 0,006 (88%\pm 0,6%)		
NEGATIVE AGREEMENT	0,89 \pm 0,006 (89%\pm 0,6%)		
POSITIVE AGREEMENT	0,67 \pm 0,154 (67%\pm 15,4%)		

Tabella 34: Valori di concordanza IFI ≥ 160 vs WB con intervallo di confidenza del 95%

Confrontando questi dati sono stati osservati gli stessi valori di prevalenza, probabilità (++), probabilità (--) e *agreement* casuale misurati nel confronto IFI 160/ ELISA 1:400. Il valore di *agreement* residuo misurato è stato dell'87,3%, mentre il valore di *agreement* massimo è stato del 99,3% e quello di k pari all'87,9% (Tabella 35).

	PREV	1-PREV
IFI160	0,06 (6%)	0,94 (94%)
WB	0,14 (14%)	0,86 (86%)
PROBABILITÀ(++);(--)	0,008 (0,8%)	0,808 (80,8%)
AGREEMENT CASUALE	0,007 (0,7%)	
AGREEMENT RESIDUO	0,873 (87,3%)	
AGREEMENT MASSIMO	0,993 (99,3%)	
K	0,879 (87,9%)	

Tabella 35: Valori di prevalenza, probabilità (++), probabilità (--), *agreement* casuale, *agreement* residuo, *agreement* massimo e K per IFI 160 vs WB.

DISCUSSIONE E CONSIDERAZIONI FINALI

Lo scopo della seconda parte sperimentale di questa tesi è stato confrontare i risultati ottenuti analizzando un campione di 100 sieri con diverse tecniche sierologiche: IFI, ELISA e WB.

Per la stima del grado di concordanza di ELISA e WB nei confronti dell'IFI, *gold standard* diagnostico per la LCan (OIE, 2008), si è scelto di esaminare tre classi di risultati: nella prima sono stati inclusi i campioni risultati positivi o negativi alla diluizione 1:40, soglia di positività della reazione; nella seconda sono stati raggruppati i sieri che avevano riportato in IFI titoli anticorpali 40 e 80, indici di un avvenuto contatto con il parassita; nella terza sono stati considerati quelli con titoli anticorpali ≥ 160 , indici di infezione in atto.

L'analisi dei dati ottenuti confrontando i risultati dell'IFI alla diluizione 1:40 con quelli dell'ELISA 1:200 ed ELISA 1:400 ha permesso di evidenziare un *overall agreement* del 71% in entrambi i casi; considerando i valori di concordanza riferiti ai soli casi nei quali entrambe le metodiche hanno dato esito positivo, interpretabile come valore di sensibilità relativa, i valori scendono di molto: 46% per ELISA 1:200 e 30% per ELISA 1:400. Decisamente più alti sono i valori di concordanza osservati in riferimento ai negativi, intesa come specificità relativa: 86% nel caso dell'ELISA 1:200 e 95% nel caso dell'ELISA 1:400.

Se si fa riferimento ai valori di K ottenuti, si nota che nel caso di IFI 40/ELISA 1:200 solo il 33,7% della concordanza osservata non è stato casuale, e nel caso di IFI 1:40/ELISA 1:400 il parametro ha assunto il valore di 28,6%.

In riferimento alla seconda classe di risultati esaminati (IFI 40-80), si nota un *overall agreement* del 69% sia per ELISA 1:200 sia per ELISA 1:400; la sensibilità relativa per ELISA 1:200 è del 35% e scende al 16% per ELISA 1:400. Più alti sono i valori di specificità relativi osservati: 86% per ELISA 1:200 e 95% per ELISA 1:400. Anche i valori di K osservati sono stati abbastanza bassi: 23,3% per ELISA 1:200 e 13% per ELISA 1:400.

I risultati ottenuti fanno supporre che l'ELISA, sia nel caso in cui i sieri vengano esaminati alla diluizione 1:200 sia nel caso della diluizione 1:400, potrebbe non individuare tutti i soggetti per i quali è stato accertato in IFI un titolo anticorpale

dubbio (40-80). I valori percentuali inferiori riportati per l'ELISA 1:400, rispetto a quanto osservato per ELISA 1:200, potrebbero essere ascritti al fatto che i campioni sono stati saggiati ad una diluizione troppo alta, che quindi non avrebbe permesso di ottenere esiti positivi per quei sieri che già in IFI avevano dato un titolo anticorpale vicino al titolo soglia (1:40).

Diversa è la situazione se si considerano soggetti per i quali sia stato attestato uno stato di infezione in atto già con l'IFI (≥ 160): in questo caso l'*overall agreement* è stata del 100% sia in ELISA 1:200 che ELISA 1:400.

I valori di sensibilità e specificità relativi sono stati del 100% e del 79%, rispettivamente, nel caso di ELISA 1:200; per ELISA 1:400 si è osservato un uguale valore di sensibilità relativa, mentre la specificità relativa è stata del 91%. Le migliori *performances* sono state confermate anche dai valori di K calcolati: 79% per ELISA 1:200 e 91% per ELISA 1:400, valori attestanti che, a differenza di quanto osservato nelle altre classi, la concordanza tra le metodiche è stata reale e non casuale. Tali risultati non possono però essere considerati assoluti in quanto il numero di soggetti che hanno presentato tale titolo anticorpale è stato esiguo (6 casi) rispetto al totale dei campioni esaminati (100).

I risultati osservati nel confronto IFI/ELISA trovano riscontro con quanto riportato da Natale *et al.* (2005), pur applicando un protocollo ELISA diverso da quello utilizzato nella nostra indagine. Tali Autori osservano come la concordanza tra le due metodiche aumenti considerando sieri positivi all'IFI a diluizioni superiori a quella del titolo soglia. Osservazioni simili erano già state fatte anche da Mancianti *et al.* (1988), che avevano osservato come il grado di concordanza tra diverse metodiche sierologiche tendesse ad aumentare analizzando i campioni ad alte diluizioni.

Quello che emerge dai nostri risultati è che, applicando il nostro protocollo ELISA alla diagnosi della LCan, potrebbero essere individuati i soggetti nei quali si può attestare un'infezione in atto, ma non sarebbe possibile identificare tutti gli animali che invece si trovano nella fase di prepatenza e che comunque giocano un ruolo importante nell'epidemiologia della malattia (Gradoni, 2004; Oliva, 2004).

A questa considerazione se ne deve aggiungere un'altra: mediante l'IFI si arriva alla definizione di un titolo anticorpale, importante per discriminare tra i cani che devono essere sottoposti a trattamento farmacologico (titolo ≥ 160) e quelli che, prima di intraprendere la terapia, necessitano invece di un ulteriore monitoraggio sierologico al fine di valutare lo stato di resistenza o meno all'infezione (titoli 40-80) (Gradoni *et al.*, 2004). L'applicazione del protocollo ELISA non permetterebbe invece questo tipo di distinzione, importante sia per l'approccio clinico al singolo caso sia per valutazioni di tipo epidemiologico. Si deve anche tenere in considerazione che tale metodica ELISA viene usata nell'attività di routine del Laboratorio di Parassitologia dell'Università di Barcellona per la diagnosi della leishmaniosi nell'uomo, per il quale il trattamento farmacologico viene intrapreso in conseguenza di una diagnosi positiva, indipendentemente dal titolo anticorpale rilevato.

In riferimento ai risultati ottenuti dal confronto IFI/WB, si può notare lo stesso andamento già osservato in riferimento al confronto IFI/ELISA. Infatti il valore di concordanza generale è del 67% sia nella prima che nella seconda classe di casi esaminati, e dell'88% considerando i soggetti nei quali l'IFI aveva riportato titoli ≥ 160 .

I valori di sensibilità relativi sono passati dal 24% nella prima classe, al 16% per i casi della seconda classe, per arrivare al 67% nei soggetti con titolo indicante infezione in atto.

Andamento leggermente diverso è stato osservato in riferimento alla specificità relativa: 92% per la prima e la seconda classe, e 89% per l'ultima classe.

Valutando l'indicatore K si osserva che, analogamente a quanto osservato per il confronto IFI/ELISA, la percentuale di concordanza non casuale, e quindi direttamente collegata alle metodiche impiegate, aumenta all'aumentare della diluizione alla quale i sieri sono stati saggiati.

Anche per il WB possono essere fatte considerazioni analoghe a quelle esposte per l'ELISA. La metodica sarebbe in grado di individuare i soggetti che si trovano in uno stadio avanzato dell'infezione, ma non assicura un uguale risultato per i soggetti ai primi stadi dell'infezione, che rivestono un ruolo fondamentale per il controllo della malattia.

Tali considerazioni trovano riscontro in quanto osservato anche da Talmi-Frank *et al.* (2006) che riferiscono come la reattività alla banda di 14 kDa possa essere associata ad uno stato di infezione persistente.

Ciò non sembrerebbe però corrispondere a quanto riportato da Mary *et al.* (1992), i quali affermano che la presenza della banda di 14kDa sarebbe invece apprezzabile quando ancora in IFI si osserva esito negativo. Una certa discordanza si osserva anche rispetto a quanto riportato da Aisa *et al.* (1998): secondo tali Autori l'apprezzamento delle bande di 12 e 14 kDa, indicherebbero un'infezione ai primi stadi.

In generale si può affermare che il grado di concordanza tra l'IFI, tecnica di riferimento nel presente studio, e le altre due metodiche sierologiche aumenta quando nell'animale si instaura una risposta anticorpale forte, che, corrisponderebbe ad una situazione di infezione attiva (Oliva, 2004).

Le motivazioni per le quali i sieri con titolo anticorpale IFI vicino al titolo soglia non hanno ripetuto uguale esito in ELISA e WB possono essere diverse.

Il fatto di aver eseguito le prove in due laboratori diversi potrebbe non aver consentito una perfetta conservazione dei campioni, soprattutto nella fase di trasporto e nelle varie ripetizioni delle prove. Ciò potrebbe aver giocato un ruolo nella degradazione degli anticorpi, con un effetto negativo soprattutto per i campioni con basso titolo anticorpale (40-80).

Si potrebbe considerare anche il fatto che nelle tre prove sono stati utilizzati 2 Ag diversi: in IFI, l'Ag è stato preparato a partire da un ceppo di *L. infantum* zimodema MON1 isolato in Italia; per ELISA e WB l'antigene impiegato è stato ottenuto a partire da un ceppo isolato in Francia. Sebbene tali ceppi appartengano entrambi allo stesso zimodema, si può ipotizzare che, essendo stati isolati in due aree diverse, non abbiano una perfetta identità antigenica e di conseguenza non ci sia stata un'identica reattività da parte dei sieri italiani.

Nonostante il numero contenuto di campioni esaminati nel presente studio, è possibile fare delle osservazioni che dovranno essere confermate mediante indagini su un campione maggiormente rappresentativo.

Per quanto riguarda l'ELISA, per una più esatta valutazione, si dovrà correlare il valore di densità ottica al titolo anticorpale, allo scopo di poter effettuare un più corretto confronto con IFI.

In riferimento al WB, nel presente studio è stata valutata esclusivamente la presenza delle bande di 12 e/o 14 kDa per decretare la positività dei campioni come suggerito da Aisa *et al.* (1998). Si potrebbe pensare di avere un quadro più completo verificando la reattività dei campioni anche nei confronti di bande di peso molecolare maggiore, come suggeriscono Ferroglio *et al.* (2007), i quali affermano che la positività ad almeno due delle bande con peso molecolare di 169, 115, 66 o 33 kDa potrebbe considerarsi sufficiente ai fini della diagnosi.

L'IFI si conferma il *gold standard* diagnostico accoppiando i valori più alti di sensibilità e specificità (Mancianti, 2006; OIE, 2008).

Nonostante la sua applicazione presenti delle limitazioni, legate soprattutto all'utilizzo in indagini su ampia scala o all'interpretazione soggettiva dei risultati, l'IFI risulta un valido strumento sia diagnostico, in grado di evidenziare i soggetti infetti, sia epidemiologico, per l'individuazione di infezioni latenti che sostengono comunque la pressione d'infezione in un'area di focolaio.

BIBLIOGRAFIA

- Aisa M.J., Castillejo S., Gallego M., Fisa R., Riera C., de Colmenares M., Torras S., Roura X., Sentis J., Portus M. (1998). Diagnostic potential of western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 58(2): 154-159.
- Albieri A., Donati L., Bellini R., Carrieri M. (2006). Spatial distribution analysis of *Aedes caspius* and *Aedes albopictus* (DIPTERA: *Culicidae*) in Milan, Italy. 1st OIE INTERNATIONAL CONFERENCE, Use of GIS in Veterinary Activities. 8-11 October 2006, Silvi Marina (TE), Abruzzo, Italy. Abstract Book, B1: 25.
- Aloï D., Rolesu S., Putzolu A., Scrugli A., Oggiano A., Chironi P., Dei Giudici S., Patta C., Basciu G., Piroddi R. (2006). Use of GIS technology in the epidemiological surveillance of african swine fever on sardinia. . 1st OIE INTERNATIONAL CONFERENCE, Use of GIS in Veterinary Activities. 8-11 October 2006, Silvi Marina (TE), Abruzzo, Italy. Abstract Book, B2: 26.
- Alvar J., Cañavate C., Molina R., Moreno J., Nieto J. (2004). Canine Leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, 57: 1-88.
- Andreani E., Cerri D., Mancianti F., Pedrini A., Nuvolosi R., Ebani V., Mani P. (1995). Gli animali di affezione quali serbatoio e vettori di agenti patogeni per l'uomo. *Rivista Italiana d'Igiene*, Anno LV, 3(4): 100-112.
- Armitage P. (1971). *Statistical Methods in Medical Research*. Blackwell Scientific Publications. Ed. Oxford and Edimburgh.
- Aronoff (1989), citato da Parente C., Santamaria R. (2004). GIS Geographic Information System. Estratto da: Claudio Parente, Raffaele Santamaria: *Sisemi Informativi Georeferiti*. Ed. Giannini, Napoli, 2004.

- Aspöck H., Gerersdorfer T., Formayer H., Walochnik J. (2008). Sandflies and sandfly-borne infections of humans in Central Europe in the light of climate change. *The Middle European Journal of Medicine*, 120(4): 24-29.
- Aspöck H., Walochnik J., Gerersdorfer T., Formayer H. (2007). Risiko-Profil für das autochthone Auftreten von Leishmaniosen in Österreich.- StartClim2006. www.austroclim.at.
- Babakhan L., Mohebbi M., Akhoundi B., Edrissian Hossein G., Keshavarz H. (2009). Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: a comparative study using fast agglutination screening test (FAST) and direct agglutination test (DAT) in Iran. *Parasitology Research*, 105(3): 717-720.
- Baldelli R., Di Francesco A. (1992). Leishmaniosi in Italia: risultati di indagini sierologiche condotte su cani di diversa provenienza geografica. Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie, Venezia-S. Giuliano, 30 Settembre, 1, 2 e 3 ottobre 1992, Vol. XLVI, pag. 1395-1399.
- Baldelli R., Di Francesco A. (1997). Sorveglianza della leishmaniosi canina in Emilia-Romagna. Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie, Bologna, 17-20 settembre 1997, Vol LI, pag. 325-326.
- Baldelli R., Di Francesco A., Della Salda L., Stegagno G., Esposito S. (1999). Leishmaniosi canina. Segnalazione di casi autoctoni in Emilia-Romagna. *Obiettivi & Documenti Veterinari*, 12: 21-24.
- Baldelli R., Battelli G., Maroli M., Mollicone E., Gudi A., Stegagno G., Tasini G. (2001). A new stable focus of canine leishmaniosis in Northern Italy. *Parassitologia*, 43: 151-153.
- Baldi L., Mizzoni V., Guarino A. (2004). Vecchi e nuovi focolai di leishmaniosi canina in Campania. *Parassitologia*, 46: 217-220.
- Bavia M.E., Madureira Trabuco Carneiro D.D., da Costa Gurgel H., Madureira Filho C., Rodrigues Barbosa M. G. (2005). Remote Sensing and Geographic Information Systems and risk of American Visceral Leishmaniasis in Bahia, Brazil. *Parassitologia*, 47: 165-169.

- Biglino A., Bolla C., Concialdi E., Trisciuglio A., Romano A., Ferroglio E. (2009). Asymptomatic *Leishmania infantum* infection in a traditionally non-endemic area of North-western Italy (Piemonte region). *Journal of Clinical Microbiology*, 48(1): 131-6.
- Biocca E., Coluzzi A., Costantini R. (1977). Osservazioni sull'attuale distribuzione dei flebotomi italiani e su alcuni caratteri morfologici differenziali tra le specie del sottogenere *Phlebotomus*. *Parassitologia*, 19: 19-37
- Blavier A., Keroack S., Denerolle Ph., Goy-Thollot I., Chabanne L., Cadorè J. L., Bourdoiseau G. (2001). Atypical forms of canine leishmaniosis. *The Veterinary Journal*, 162: 108-120
- Boarino A., Bollo E., Prunotto L., Canale L., Uslenghi F., Poletti P. (2008). Application of a recombinant protein for the serological diagnosis of canine leishmaniosis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 31: 527-536.
- Bongiorno G., Habluetzel A., Traldi G., Maroli M. (2002). Notes on the sand fly fauna and their feeding habitus from an inland focus of canine leishmaniosis in central Italy (Marche region). *Parassitologia*, 44 (1), 23.
- Bourdoiseau G., Bonnefont C., Hoareau E., Boehringer C., Stolle T., Chabanne L. (1997). Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 59: 21-30.
- Brandonisio O., Carelli G., Ceci L., Consenti B., Fasanella A., Puccini V. (1990). Indagine sulla diffusione della leishmaniosi nel cane e nell'uomo sul promontorio del Gargano. *Parassitologia*, 32 (Suppl. 1): 31-32.
- Brianti E., Ludovisi A., Di Muccio T., Sorgi C., Gaglio G., Gramoccia M., Poglayen G. (2004). Natural case of leishmaniosis in a domestic ferret (*Mustela putorius furo*). *Parassitologia*, 46 (Suppl. 1), 29.

- Brianti E., Gaglio G., Giannetto S., Poglayen G., Gramiccia M., Gradoni L. (2005). A cross-sectional study of canine leishmaniasis with serology and Nested Polymerase Chain Reaction in Salina Island (Southner Italy). Abstract book of the third World Congress on Leishmaniosis. Palermo-Terrasini Sicily, Italy, 10-15 April 2005, 119.
- Brianti E., Drigo M., Zirilli V., Poglayen G., Giannetto S. (2007). Use of a Health Information System (HIS) for the Epidemiological Surveillance of Leishmaniasis in Urban Areas. *Veterinary Research Communications*, 31(1): 213-215.
- Bucci A., Puccini V., Casaglia O., Colella G. (1975). Epizootologia della leishmaniosi in provincia di Foggia: la leishmaniosi canina. *Parassitologia*, XVII, N° 1-2-3: 25-37.
- Burns *et al.* (1993), citato da Scalone A., De Luna R., Oliva G., Baldi L., Satta G., Vesco G., Mignone W., Turilli C., Mondesire R. R., Simpson D., Donoghue A. R., Frank G. R., Gradoni L. (2002). Evaluation of the Leishmania recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized anzyme-linked immunosorbent assay. *Veterinary Parasitology*, 104: 275-285.
- Burrough (1986), citato da Parente C., Santamaria R. (2004). GIS Gepgraphic Information System. Estratto da: Claudio Parente, Raffaele Santamaria: Sisemi Informativi Georeferiti. Ed. Giannini, Napoli, 2004.
- Candido T.C., Venturioli Perri S.H., de Oliveira Gerzoschkwitz T., Rui Luvizotto M.C., de Lima V.M.F. (2008). Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on crude and purified antigen in the diagnosis of canine visceral leishmaniosis in symptomatic and oligosymptomatic dogs. *Veterinary Parasitology*, 157: 175-181.
- Capelli G., Baldelli R., Ferroglio E., Genchi C., Gradoni L., Gramiccia M., Maroli M., Mortarino M., Pietrobelli M., Rossi L., Ruggiero M. (2004). Monitoraggio della leishmaniosi canina in nord

Italia: aggiornamenti da un network scientifico. *Parassitologia*, 46: 193-197.

- Cardoni G., Spagnulo M.L. (2006). Development of an experimental GIS for bee-keeping in the Marche region, Italy. 1st OIE INTERNATIONAL CONFERENCE, Use of GIS in Veterinary Activities. 8-11 October 2006, Silvi Marina (TE), Abruzzo, Italy. Abstract Book, A2: 7.
- Cassini R., Pietrobelli M., Montarsi F., Natale A., Capelli G., Beraldo P., Sinigaglia A., Moresco G. (2007). Leishmaniosi canina in Triveneto: quali novità?. *Il Progresso Veterinario*, 7: 295-300.
- Castagnaro M., Crotti A., Fondati A., Gradoni L., Lubas G., Maroli M., Oliva G., Paltrinieri S., Solano-Gallego L., Roura X., Zatelli A., Zini E. (2007). LEISHMANIOSI CANINA: LINEE GUIDA SU DIAGNOSI, STADI AZIONE, TERAPIA, MONITORAGGIO E PREVENZIONE Parte I: Approccio diagnostico e classificazione del paziente leishmaniotico e gestione del paziente proteinurico. *Veterinaria*, 21(3): 19-32.
- Catarsini O. (1981). Epidemiologia e manifestazioni cliniche della leishmaniosi del cane. *Rivista di Parassitologia*, Vol. XLII, 2:83-87.
- Cavallina R., Masotti G., Macrì G., Lillini E. (1989). Dati sulla diagnostica diretta e indiretta del cane nel Lazio, in Toscana ed in altre regioni italiane dal 1977 al 1988. Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie, Pisa, 5-6-7 Ottobre, vol XLIII.
- Chanotis B., Spyridaki I., Scoulika E, Antoniou M. (2000). Colonization of *Phlebotomus neglectus* (Diptera: Psychodidae), the major vector of visceral leishmaniasis in Greece. *Journal of Medical Entomology*, 37(3): 346-8.
- Ciarallo N. (1991). Epidemiologia della leishmaniosi in un'area collinare prospiciente il mare Adriatico della regione Molise. *Progresso Veterinario*, 23: 787-790.
- Ciaramella P., Oliva G., De Luna R., Gradoni L., Ambrosio R., Cortese L., Scalone A., Persechino A. (1997). A retrospective

clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Record*, 141: 539- 543.

- Colella G., Casamassina E. (1979). La leishmaniosi del cane in provincia di Matera. *Clinica Veterinaria*, 102: 35.
- Corona M., Ciaramella P., Pelagalli A., Cortese L., Pero M.E., Santoro D., Lombardi P. (2003). Valutazione dell'aggregazione piastrinica in cani affetti da leishmaniosi a diverso stadio clinico. Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie, LVII, Ischia, Napoli, 327-328.
- Courtenay O., Quinnell R.J., Dye C. (2001). The role of foxes (*carnivora: canidae*) in the maintenance and transmission of *Leishmania infantum*: implications for peridomestic control. Summaries of Presentation at the International Canine Leishmaniasis Forum, Crete (Greece), 20- 24 May 2001, 17-23.
- Cowen (1988), citato da Parente C., Santamaria R. (2004). GIS Geographic Information System. Estratto da: Claudio Parente, Raffaele Santamaria: Sisemi Informativi Georeferiti. Ed. Giannini, Napoli, 2004.
- Cringoli *et al.* (2001) citato da Rinaldi L., Cascone C., Sibilio G., Musella V., Taddei R., Cringoli G. (2004). I GIG (Geographic Information System) e la tecnologia satellitare nella epidemiologia delle parassitosi. *Parassitologia*, 46: 71-74.
- Cross E. R., Hyams K. C. (1996). The Potential Effect of Global Warming on the Geographic and Seasonal Distribution of *Phlebotomus papatasi* in Southwest Asia. *Environmental Health Perspectives*, 104(7): 724-727.
- Da Silva E.S., van der Meide W.F., Schoone G.J., Gontijo C.M.F., Schallig H.D.F.H., Brazil R.P. (2006). Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. *Veterinary Research Communications*, 30:637-643.

- Dalla Villa P., Ruggeri F. (1999). Situazione epidemiologica della leishmaniosi canina nella provincia di Pescara. Convegno Igiene Urbana Veterinaria, Roma.
- De Castro Ferreira E., de Lana M., Carneiro M., Barbosa reia A., Vieira Paes D., da Silva E., Schallig H., Ferreira Gontijo C. M. (2007). Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniosis in animals presenting different clinical manifestations. *Veterinary Parasitology*, 146: 235:241.
- Dereure J., Pratlong F., Dedet J.P. (1999). Geographical distribution and the identification of parasites causing canine Leishmaniasis in the Mediterranean basin. Canine Leishmaniasis: an update, Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum, Barcellona (Spain), 28 – 31 January 1999, 18- 25.
- Dereure J., Vanwambeke S. O., Malè P., Martinez S., Pratlong F., Balard Y., Dedet J.P. (2009). The Potential Effects of Global Warming on Changes in Canine Leishmaniasis in a Focus outside the Classical Area of the Disease in Southern France. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 1-7.
- Di Muccio T., Scalone A., Ludovisi A., Orsini S., Brianti E., Gaglio G., Forino D., Idone P., Libranti L., Gradoni L., Poglayen G., Gramiccia M., Giannetto S. (2004). Comparative performances of sierological, parasitological and molecular techniques for the detection of canine leishmaniasis in the endemic focus of Salina Island, Italy. *Parassitologia*, 46 (Suppl. 1), 39.
- Diaferia M., Veronesi F., Piergili Fioretti D. (2005). Leishmaniosi canina nella regione Umbria: aggiornamenti epidemiologici. Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie, Vol LIX, pag. 131-132.
- Dietze R., Falqueto A., Pedrosa Valli L. C., Pereira Rodriguez T., Boulos M., Corey R. (1995) Diagnosis of canine visceral leishmaniasis with a dot-Enzyme- Linked Immunosorbent assay. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 53(1): 40-42.

- DoE (1987), citato da Parente C., Santamaria R. (2004). GIS Geographic Information System. Estratto da: Claudio Parente, Raffaele Santamaria: Sisemi Informativi Georeferiti. Ed. Giannini, Napoli, 2004.
- Dujardin J.C., Campino L., Cañavate C., Dedet J. P., Gradoni L., Soteriadou K., Mazeris A., Ozbel Y., Boelaert M. (2008). Spread of Vecto-borne Diseases and Neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 14 (7): 1013-1018.
- Fernández-Pérez F., Mendez S., de la Fuente C., Cuquerella M., Gómez M. T., Alunda J., M. (1999). Value of western blot in the clinical follow-up of canine Leishmaniasis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11: 170-173.
- Ferreira S. A., Ituassu L. T., de Melo M. N., de Andrade A. S. R. (2008). Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 152: 257-263.
- Ferrer L. (1999). Clinical aspects of canine leishmaniasis. Prooceding of a Canine Leishmaniasis Forum, Barcelona (Sitges), 6-10.
- Ferroglio E., Mignone W., Saracco M., Raimondo C., Gastaldo S., Triscioglio A., Mancianti E., Guiso P., Tarello V., Ambrogio M., Trentin C., Balocchi E., Furno R., Sala L. (2002). Prevalence of seroreactors to *Leishmania infantum* in the canine population of North-West Italy. *Parassitologia*, 44 (1): 68.
- Ferroglio E., Maroli M., Gastaldo S., Mignone W., Rossi L. (2005). Canine Leishmaniasis, Italy. *Emerging Infectious Diseases*, 11 (10): 1618-1620.
- Ferroglio E., Centaro E., Mignone W., Triscioglio A. (2007) Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog as compared with immunofluorescence assay and Western blot. *Veterinary Parasitology*, 144: 162-166.

- Fisa R., Gallego M., Riera C., Aisa M.J., Valls D., Serra T., De Colmenares M., Castillejo S., Portus M. (1997). Serologic diagnosis of canine leishmaniasis by dot-ELISA. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 9: 50-55.
- Fisa R., Riera C., Gallego M., Manubens J., Portus M. (2001). Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Veterinary Parasitology*, 99: 105-111.
- Franceschi A., Mortarino M., Mancianti M., Corazza M., Bazzocchi C., Bandi C. (2005). Canine leishmaniasis: monitoring the therapy by a real-time PCR assay. Third World Congress on Leishmaniasis (Worldleish 3). April 9-15, 2005. Palermo-Terrasini, Sicily, Italy, Abstract book pag. 140.
- Francino O., Altet L., Sánchez-Robert E., Rodriguez A., Solano-Gallego L., Alberola J., Ferrer L., Sánchez A., Roura X. (2006). Advantages of a real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 137: 214-221.
- Gomes Y. M., Paiva Cavalcanti M., Lira R. A., Abath F. G. C., Alves L. C. (2008). Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological avances. *The Veterinary Journal*, 175: 45-52.
- Gradoni L. (1996). Epidemiologia. Quaderni di Veterinaria. La leishmaniosi canina a cura di S. Pizzirani, 18-22.
- Gradoni L. (1999). Aspetti epidemiologici recenti della Leishmaniosi Viscerale Umana in Italia. Atti del Congresso di Igiene Urbana Veterinaria, Roma, 14-16 dicembre 1999, Abstract book pag. 127.
- Gradoni L. (2002). The diagnosis of canine leishmaniasis. Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla (Spain), 6-9 February 2002, 21- 24.
- Gradoni L., Gramiccia M., Pozio E., Maroli M., Bettini S. (1980). Laishmaniosi canina in due focolai della provincia di Grosseto. *Parassitologia*, 22: 316-318.

- Gradoni L., Gramiccia M., Mancinati F., Pieri S. (1988). Studies on canine leishmaniasis control. 2. Effectiveness of control measures against canine leishmaniasis in the Isle of Elba, Italy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88: 568-571.
- Gradoni L., Scalone A., Gramiccia M. (1993). HIV-Leishmaniasis co-infections in Italy: serological data as an indication of the sequence of acquisition of the two infections. *Transaction of the Royal Society* 100.
- Gradoni L., Gramiccia M. (1994). Leishmania infantum Tropism: Strain Genotype or Host Immune Status?. *Parasitology Today*, 10 (7): 264-267.
- Gradoni L., Pizzuti R., Scalone A., Russo M., Gramiccia M., di Martino L., Pempinello R., Gaeta G.B. (1996). Recrudescence of visceral leishmaniasis unrelated to HIV infection in the Campania region of Italy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 90: 234-235.
- Gradoni L., Gramiccia M., Scalone A. (2003). Visceral leishmaniasis treatment, Italy. *Emerging Infectious Disease*, 9: 1617-1620.
- Gradoni L., Gramiccia M., Khoury C., Maroli M. (2004). Linee guida per il controllo del serbatoio canino della leishmaniosi viscerale zoonotica in Italia. *Rapporti dell'Istituto Superiore di Sanità*, 12.
- Gramiccia M. (1997). Le leishmaniosi del Vecchio Mondo. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 33 (2): 231-239.
- Gramiccia M. (2003). The identification and variability of the parasites causing leishmaniasis in HIV-positive patients in Italy. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 97(1): 65–73.
- Gramiccia M., Gradoni L., di Martino L., Romano R., Ercolini D. (1992). Two syntopic zymodemes of *Leishmania infantum* cause human and canine visceral leishmaniasis in the Naples area, Italy. *Acta Tropica*, 50:357-359.
- Gramiccia M., Ludovisi A., Nardoni S., Di Muccio T., Mancianti F. (2002). PCR and Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis

in peripheral blood from dogs living in endemic areas of Italy. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50: 36.

- Gramiccia M., Di Muccio T., Marinucci M. (2004). Identificazione del parassita nella sorveglianza dei casi importati di leishmaniosi in Italia. *Parassitologia*, 46:207- 210.
- Gramiccia M., Gradoni L. (2005). The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal of Parasitology*, 35: 1169-1180.
- Gravino A.E. (2004). Interpretazione del dato di laboratorio in corso di leishmaniosi criptica nel cane. *Parassitologia*, 46, 207-210.
- Ikonopoulou J., Kokotas S., Gazouli M., Zavras A., Stoitsiou M., Gorgoulis V. G. (2003). Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Veterinary Parasitology*, 113: 99-113.
- Ivozić V., Depaquit J., Léger N., Urano A., Apadopoulos B.(2004). Sandflies (Diptera: Psychodidae) in the Bar area of Montenegro (Yugoslavia). 2. Presence of promastigotes in *Phlebotomus neglectus* and first record of *P. Kandelakii*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 98 (4): 425-427.
- Ivozić V., Patakakis M, Tselentis Y, Chaniotis B. (2007). Faunistic study of sandflies in Greece. *Medical and Veterinary Entomology*, 21(1):121-4.
- Killick-Kendrick R., Ready P.D., Pampiglione S. (1977). Notes on the prevalence and host preferences of *Phlebotomus perfiliewi* in Emilia Romagna, Italy. In: *Ecologie des leishmaniosis. Colloques Internationaux CNRS-n°239*:169-175.
- Killick- Kendrick R. (2002). The life-cycles of *Leishmania* in the sand fly and transmission of leishmaniasis by bite. Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla (Spain), 6-9 February 2002, Abstract book pag. 57- 68.

- Kontos V.J. e Koutinas A.F. (1993). Old World Canine Leishmaniasis. *The Compendium*, 15 (7): 949-961.
- Jeffe C.L., and Zalis M. (1988). Use of purified proteins from *Leishmania donovani* for the rapid serodiagnosis of visceral leishmaniosis. *Journal of Infective Disease*, 157: 1212-1220.
- Lachaud L., Marchergui-Hammami S., Chabbert E., Dereure J., Dedet J. P., Bastien P. (2002). Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (1): 210-215.
- Lasri S., Sahibi H., Natami A., Rhalem A. (2003). Western blot analysis of *Leishmania infantum* antigens using sera from pentamine-treated dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 91: 13-18.
- Liarte D.B., Mendonça I. L., Luz F. C.O., de Abreu E. A. S., Mello G. W. S., Farias T. J. C., Ferreira A. F. B., Millington M. A., Costa C. H. N. (2001) QBC ® for the diagnosis of human and canine american visceral leishmaniasis: preliminary data. *Revista de Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 34 (6): 577-581.
- Lillini E., Cavallina R., Piragino S., Aleandri M.: (1979). Indagine sulla leishmaniosi del cane nel territorio di Roma. Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie, Vol. XXXIII, pag 282.
- Macrì G. (1999). La leishmaniosi canina: aspetti clinici ed epidemiologici con particolare riferimento alla diffusione della malattia a Roma e nel Lazio. Atti del Congresso di Igiene Urbana Veterinaria, Roma, 14-16 dicembre 1999, Abstract book pag. 129-130.
- Macrì G., Rombolà P., Miveli M., Scarpulla M., Pettirossi N., Lillini E. (2005). Seroprevalence of canine leishmaniosis in Latium region. Third World Congress on Leishmaniasis (Worldleish 3). April 9-15, 2005. Palermo-Terrasini, Sicily, Italy, Abstract book pag, 162.

- Maia C., Campino L. (2008). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*, 158: 274-287.
- Maia et al. (2007), citato da Maia C., Ramada J., Cristóvão J. M., Gonçalves L., Campino L. (2009). Diagnosis of canine leishmaniosis: Conventional and molecular techniques using different tissues. *The Veterinary Journal*, 179: 142-144.
- Maia C., Ramada J., Cristóvão J. M., Gonçalves L., Campino L. (2009). Diagnosis of canine leishmaniosis: Conventional and molecular techniques using different tissues. *The Veterinary Journal*, 179: 142-144.
- Malone J.B., Bergquist N.R., Huh O.K., Babia M.E., Bernardi M., El Bahy M.M., Fuentes M.V., Kristensen T.K., McCarroll J.C., Yilma J.M., Zhou X.N. (2001). A global network for the control of snail-borne disease using satellite surveillance and geographic information systems. *Acta Tropica*, 79: 7-12.
- Mancianti F. (2004). Leishmaniosi felina: quale ruolo epidemiologico? *Parassitologia*, 46, 203-206.
- Mancianti F., Marconcini A., Ceccanti G., Bisaro B. (1985). Leishmaniosi canina nella Bassa Val di Cornia-Livorno. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Pisa*, 38: 325-329.
- Mancianti F., Gradoni L., Gramiccia M., Pieri S., Marconcini A. (1986). Canine leishmaniasis in the Isle of Elba, Italy. *Tropical Medicine and Parasitology*, 37: 110-112.
- Mancianti F., Meciani N. (1988). Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemoagglutination and counterimmunoelectrophoresis. *American Journal of Veterinary Research*, 49: 1409-1411.
- Mancianti F., Falcone M.L., Giannelli C., Poli A. (1995). Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect

immunofluorescence for diagnosis of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 59: 13-21.

- Mancianti F., Pedonese F., Poli A. (1996). Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescence assay. *Veterinary Parasitology*, 65: 1-9.
- Manna L., Reale S., Viola E., Foglia Manzillo V., Vitale F., Lupo T., Gravino A. E. (2004). Follow-up post treatment in *Leishmania infantum* naturally infected dogs by real-time PCR. *Parassitologia*, 48: 211.
- Manna L., Vitale F., Reale S., Caracappa S., Pavone L. M., Della Morte R., Cringoli G., Staiano N., Gravino A. E. (2006). Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 125: 251-262.
- Mansueto S., Di Leo R., Miceli M.D., Quartararo P. (1982). Canine leishmaniosis in three foci of Western Sicily. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 76: 565.
- Mantovani A., Canestri-Trotti G., Battelli G., Nipoti C., Pampiglione S. (1982). Considerazioni sull'indagine sierologica di massa eseguita in occasione dell'episodio di leishmaniosi viscerale verificatosi in Emilia-Romagna (1971-1972). *Giornale di Malattie Infettive e Parassitarie*, Estratto dal N. 11 bis, Vol. 34, pag. 1-12.
- Maroli M. (1999). I vettori di Leishmaniosi in ambiente urbano. Atti del Congresso di Igiene Urbana Veterinaria, Roma 14-16 Dicembre 1999, Abstract book pag. 131-135.
- Maroli M. (2004). Leishmap: the network for monitoring the spreading of canine leishmaniasis and phlebotomine vectors in Northern Italy. Atti congresso internazionale sulla leishmaniosis canina, Napoli (Italia), 17-18 Aprile 2004, 109-112.
- Maroli M., Lavagnino A., Ansaldi G., Cavallini C. (1990). Leishmaniasis vectors (Diptera, Psychodidae) in 3 different

environments of western Sicily and 2 of the Aeolian Islands. *Parassitologia*, 32(3): 305-311.

- Maroli M., Sansoni L., Bigliocchi F., Khoury C., Valsecchi M. (1995). Reperimento di *Phlebotomus neglectus* Tonnoir, 1921 (=P. major s.l.) in un focolaio di leishmaniosi nel nord Italia (Provincia di verona). *Parassitologia*, 37:241-244.
- Maroli M., Khoury C., Bianche R., Ferroglio E., Natale A. (2002). Recent findings of *Phlebotomus neglectus* Tonnoir, 1921 in Italy and its western limit of distribution. *Parassitologia*, 44:103-109.
- Maroli M. e Khoury C. (2004). Prevenzione e controllo dei vettori di leishmaniosi: attuali metodologie. *Parassitologia*, 46, 211-215.
- Maroli M., Rossi L., Baldelli R., Capelli G., Ferroglio E., Genchi C., Bramiccia M., Mortarino M., Pietrobelli M., Gradoni L. (2008). The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Tropical Medicine and International Health*, 13(2): 256-264.
- Martin S.W., Meek A.H., Willeberg P. (1987). Measurements of disease frequency and production in S.W. Martin AH Meek Willeberg P. (eds.). *Veterinary Epidemiology : Principles and Methods*. Iowe State University Press, Ames, Iowa, pag. 73-76.
- Martin-Sanchez J., Morales-Yuste M., Acedo-Sanchez, Baròn S., Diaz V., Morillas-Merquez. (2009). Canine Leishmaniasis in Southeastern Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 15(5): 795-798.
- Martorino M., Maroli M., Gradoni L., Mancianti F., Franceschi A., Bertazzoli G., Paolini M., Genchi C. (2004). A new stable leishmaniasis focus in Brescia, Northern Italy: preliminary investigation. *Parassitologia*, 46 (1): 53.
- Marty P., Lelievre A., Quaranta J-F., Suffia I., Eulalio M., Gari-Toussaint M., Le Fichoux Y., Kubar J. (1995). Detection by Western blot of four antigens characterizing acute clinical leishmaniasis due

to *Leishmania infantum*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 89: 690-691.

- Mastropietro A. (1953). Segnalazione del primo caso di leishmaniosi del cane a Campobasso. *Atti della Società Italiana di Scienze Veterinarie*, Vol VII, pag 894-898.
- Mettler M., Grimm F., Capelli G., Camp H., Deplazes P. (2005). Evaluation of Enzyme-linked immunosorbent assay, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 11: 5515-5519.
- Mignone W., Poggi M., Aglietti S., Mancianti F. (1991a). ASPETTI RECENTI DELLA LEISHMANIOSI CANINA NELLA RIVIERA LIGURE DI Ponente. Segnalazione di focolai e loro valutazione preliminare. *Selezione Veterinaria*, 32: 837-841.
- Mignone W., Poggi M., Mancianti F. (1991b). ASPETTI RECENTI DELLA LEISHMANIOSI CANINA NELLA RIVIERA LIGURE DI Ponente. Indagine epidemiologica nei canini della provincia di Imperia. *Progresso Veterinario*, 23:790-792.
- Mikaeili F, Fakhar M, Sarkari B, Motazedian MH, Hatam G.(2007). Comparison of serological methods (ELISA, DAT and IFA) for diagnosis of visceral leishmaniasis utilizing an endemic strain. *Iranian Journal of Immunology*, 4 (2): 116-21.
- Mohebbali M., Taran M., Zarei Z. (2004). Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick rk39 test and direct agglutination. *Veterinary Parasitology*, 121: 239-245.
- Mollicone E., Baldelli R. (2003). Leishmaniosi canina: indagine epidemiologica in un Comune della Provincia di Bologna. *Veterinaria*, 17(3):49-55.

- Mollicone E., Battelli G., Gramiccia M., Maroli M., Baldelli R. (2003). A stable focus of canine leishmaniosis in Bologna province, Italy. *Parassitologia*, 45: 85-88.
- Moreira E.D., Mendes de Souza V.M., Sreenivasan M., Nascimento E. G., Pontes de Carvalho L. (2004). Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. *Veterinary Parasitology*, 122: 245-252.
- Moreira M. A. B., Luvizotto M. C. R., Garcia J. F., Corbett C. E. P., Laurenti M. D. (2007) Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Veterinary Parasitology*, 145 245-252.
- Moretti A., Piergili Fioretti D. (1995). Leishmaniosi canina: indagine siero epidemiologica sulla popolazione canina randagia in provincia di Perugia. *Obiettivi e Documenti Veterinari*, n°10: 19-25.
- Moretti A., Piergili Fioretti D., Papili R., Pagliacci T., Bigarini R., Mancini S., Giannelli R., Polidori G. A. (1996). Leishmaniasis in Umbria (Central Italy): current trends in research on the epidemiology of animal and human infection. *Giornale Italiano di Malattie Infettive*, 3: 166-172.
- Mortarino M., Franceschi A., Mancianti F., Bazzocchi C., Genchi C., Bandi C. (2004). PCR quantitativa nella diagnosi di *Leishmania*. *Parassitologia*, 46: 163-167.
- Mott K.E., Nuttall I., Desjeux P., Cattand P. (1995). New geographical approaches to control of some parasitic zoonoses. *Bulletin of the World Health Organization*, 73(2): 247-257.
- Mylonakis ME., Papaioannou N., Saridomichelakis MN., Koutinas AF., Billinis C., Kontos VI. (2005). Cytologic patterns of lymphadenopathy in dogs infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Clinical Pathology*, Sep; 34 (3): 243-247.
- Natale A., Capelli G., Passarini G., Frangipane di Regalbono A., De Guelmi S., Vescellari M., Gramiccia M., Pietrobelli M. (2005). Surveillance of CanL in a new endemic area by *Leishmania* in North-

eastern Italy in 2004. Third World Congress on Leishmaniosis, 10-15 Aprile 2005, Palermo-Terrisi, Sicilia, Italy, Abstract book pag. 181.

- Natale A., Carnieletto P., Pietrobelli M., Capelli G., Nardelli S. (2005). Performance di un test ELISA e prova di ripetibilità di un test IFI per la diagnosi sierologica di leishmaniosi canina. Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie, vol LIX, pag 133-134.
- OIE (2008). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. OIE, Paris.
- Oliva G., Cortese L., Ciaramella P., De Luna R. (1996). Trattamento terapeutico della leishmaniosi del cane. *Veterinaria*, 10 (3):115-127.
- Oliva G., Foglia Manzillo V., Pagano A. (2004). Evoluzione dei protocolli terapeutici in corso di leishmaniosi canina. *Parassitologia*, 46:231-234.
- Oliva G., Scalone A., Foglia Manzillo V., Gramiccia M., Pagano A., Di Muccio T., Gradoni L. (2006). Incidence and Time Course of *Leishmania infantum* Infections Examined by Parasitological, Serological, and Nested-PCR Techniques in a Cohort of Naive Dogs Exposed to Three Consecutive Transmission Seasons. *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (4), 1318-1322.
- Oliveira E., Pedras M. J., Moraris de Assis I. E., Rabello A. (2009). Improvement of direct agglutination test (DAT) for laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* (In press).
- Otranto D., Paradies P., Lia R.P., Latrofa M.S., Testini G., Cantacessi C., Mencke N., Galli G., Capelli G., Stanneck D. (2007). Efficacy of a combination of 10% imidocloprid/50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in pennelle dogs in an endemic area. *Veterinary Parasitology*, 144: 270-278.
- Otranto D. (2009). La leishmaniosi del cane: tutto ciò che avreste voluto chiederci. *La Settimana Veterinaria*, 657:5-30.

- Ozemoy *et al.* (1981), citato da Parente C., Santamaria R. (2004). GIS Geographic Information System. Estratto da: Claudio Parente, Raffaele Santamaria: Sisemi Informativi Georeferiti. Ed. Giannini, Napoli, 2004.
- Paglia M.G., Gentile M., Pupillo L.P. (2004). Evaluation of PCR-RFLP analysis for detection and identification of *Leishmania* species. *Parassitologia*, 46 (Suppl. 1), 183.
- Palarchi M., Lillini E., Cavallini R., Zanchi R., Tasselli E. (1979). Indagini sulla Leishmaniosi del cane ne territorio di Firenze. Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie, Vol XXX, pag. 280.
- Pampiglione S., Manson-Bahr PE., La Placa M., Borgatti MA, Musumeci S. (1974). Studies in Mediterranean leishmaniasis. 3. The leishmanin skin test in Kala-azar. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 69: 60-68.
- Parker (1988), citato da Parente C., Santamaria R. (2004). GIS Geographic Information System. Estratto da: Claudio Parente, Raffaele Santamaria: Sisemi Informativi Georeferiti. Ed. Giannini, Napoli, 2004.
- Parente C., Santamaria R. (2004). GIS Geographic Information System. Estratto da: Claudio Parente, Raffaele Santamaria: Sisemi Informativi Georeferiti. Ed. Giannini, Napoli, 2004.
- Pedras M. J., de Gouvêa Viana, de Oliveira E. J., Rabello A. (2008). Comparative evaluation of direct agglutination test, rK39 and soluble ELISA and IFAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102:172-178.
- Pennisi M.G., Masucci M., Catarsini O. (1998). Presenza di anticorpi anti-*Leishmania* in gatti FIV+ che vivono in zona endemica. Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie, Vol LII, pag. 265-266.
- Pennisi M.G., Maxia L., Vitale F., Masucci M., Borrato G., Caracappa S. (2000). Studio dell'infezione da *Leishmania* mediante

PCR in gatti che vivono in zona endemica. Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie, Vol LIV, pag. 215-216.

- Perrucci S., Pinello E., Fichi G., Ciardi E., Barberi P., Moonen C., Ragaglini G., Bibbiani C. (2006). Pasture- and soil-transmitted parasitic infections of grazing cattle in an organic farm in Tuscany (Italy): determination of climatic, environmental, farm management and individual animal risk factors using geographical information systems. 1st OIE INTERNATIONAL CONFERENCE, Use of GIS in Veterinary Activities. 8-11 October 2006, Silvi Marina (TE), Abruzzo, Italy. Abstract Book, A7: 12.
- Peverieri (1995), citato da Parente C., Santamaria R. (2004). GIS Geographic Information System. Estratto da: Claudio Parente, Raffaele Santamaria: Sisemi Informativi Georeferiti. Ed. Giannini, Napoli, 2004.
- Piccolo L., Ceretti G., Capelli G., Manca G., Poglayen G. (1999). LEISHMANIOSI CANINA: LA SITUAZIONE IN VENETO. // *Progresso Veterinario*, 19: 991-996.
- Pilatti M. M., Ferreira S. A., de Melo M. N., de Andrade A. S. R. (2009). Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in conjuntival swab samples. *Research in Veterinary Science*, 87:255-257.
- Poglayen G., Marangon S., Manca MG., Capelli G., Dalla Pozza M., Casati D., Vantini E., Bressan G., Passarini G. (1997). A new outbreak of canine leishmaniosis in the North-East of Italy. *Acta Parasitologica*, 21 (1):143.
- Poglayen G., Baldelli R., Pirrera A., Di Francesco A., Piva S., Miccicchè A., Sorgi C. (2005a). MONITORING OF CANINE LEISHMANIOSIS IN THE AGRIGENTO PROVINCE (ITALY). 3th World Congress on Leishmaniosis, Palermo-Terrasini (Italy), April 10-15 2005. Abstract book, pag 201.
- Poglayen G., Bonofiglio T., Scarpelli G., Brianti E., Lazzarone F. (2005b). Canine leishmaniosis and dog pound: an experience in the

province of Cosenza (Italy). *Atti della Società Italiana delle Scienze veterinarie*, vol LIX, pag. 135-136.

- Poglayen G., Brianti E., Baldelli R., Piva S. (2008). Retrospective analysis of canine leishmaniosis cases in the eastern part of the Emilia-Romagna region. *Parassitologia*, 50(1): 157.
- Poli G. (1996). Diagnostica sierologica. Le reazioni antigene-anticorpo in vitro. In: *Microbiologia Immunologia Veterinaria* (Poli G e cocilovo A.). UTET, Torino, 645-667.
- Polidori G. A., Vitellozzi G., Agostinelli A., Principato M. (1980). Indagine sulla fauna parassitaria in cani della città di Terni. *Parassitologia*, XXII: 349-350.
- Pozio E., Maroli M., Gradoni L., Gramoccia M. (1985). Laboratory transmission of *Leishmania infantum* to *Rattus rattus* by the bite of experimentally infected *Phlebotomus perniciosus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 79, 524-526.
- Rajasekariah G-Halli R., Cardoso L., Dogcio D.A., Martin S. K., Smithyman A. M. (2008) A Novel Exo-antigen-based ELISA for the detection of canine Leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 78(4):616-623.
- Rami M., Atarhouch T., Dakkak A. (2005). Identification of two highly performing *Leishmania infantum* antigens for serodiagnosis of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 134:25-31.
- Reale S., Maxia L., Vitale F., Glorioso N. S., Caracappa S., Vesco G. (1999). Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *Journal of Clinical Microbiology*, 37 (9):2931-2935.
- Riera C., Valkladares J. E., Gállego M., Aisa M. J., Castillejo S., Fisa R., Ribas N., Carrió J., Alberola J., Arboix M. (1999). Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Veterinary Parasitology*, 84: 33-47.

- Rinaldi L., Cascone C., Sibilio G., Musella V., Taddei R., Cringoli G. (2004). I GIG (Geographic Information System) e la tecnologia satellitare nella epidemiologia delle parassitosi. *Parassitologia*, 46: 71-74.
- Romano R., Mazzacuva N., Nava D., Caligiuri V., Federico G. (1990). La leishmaniosi del cane in Calabria. Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie, Vol. XLIV, 27-28 Settembre 1990, Stresa, pag. 156.
- Romero-Peñuela M. H., Sanchez-Valencia J. A. (2007). El diagnóstico de la leishmaniasis visceral canina (*Leishmania infantum*). *Vet. Zootec.*, 1(1): 51-59.
- Romi R., Khoury C., Bigliocchi F., Maroli M. (1994). Schede guida su acari e insetti di interesse sanitario. Istituto Superiore di Sanità, Roma, 33-42.
- Rosati S., Ortaffi M., Profiti M., Mannelli A., Mignone W., Bollo E., Gradoni L. (2003). Prokaryotic expression and antigenic characterization of three recombinant *Leishmania* antigens for serological diagnosis of canine leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10 (6):1153-1156.
- Rossi L., Ferroglio E., Guiso P., Ferraris P., Pancaldi P. (1999). Segnalazione di un focolaio di leishmaniosi canina sulla collina torinese. *Medicina Veterinaria Preventiva*, 20.
- Rossi E., Buongiorno G., Scalone A., Di Muccio T., Ciolli E., Gramoccia M., Gradoni L., Maroli M. (2004). Epidemiological studies in a new canine leishmaniasis focus in Rome province, central Italy. *Parassitologia*, 46 (Suppl.1), 63.
- Rossi L., Baldelli R., Capelli G., Ferroglio E., Genchi C., Gradoni L., Gramiccia M., Maroli M., Mortarino M., Pietrobelli M., Ruggiero M. (2005). Leishmap: the network for monitoring the spread of canine leishmaniasis and its vectors in northern Italy. Third World Congress on Leishmaniosis. 10-15 April 2005, Palermo, Terrasini, Sicily (Italy), Abstract book, 201.

- Rosypal A. C., Troy G. C., Duncan R. B., Zajac A. M., Lindsay D. S. (2005) Utility of diagnostic tests used in diagnosis of infection in dogs experimentally inoculated with a north American isolate of *Leishmania infantum infantum*. *Journal of Internal Medicine*. 19:802-809.
- Scalone A., De Luna R., Oliva G., Baldi L., Satta G., Vesco G., Mignone W., Turilli C., Mondesire R. R., Simpson D., Donoghue A. R., Frank G. R., Gradoni L. (2002). Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Veterinary Parasitology*, 104: 275-285.
- Scarampella F., Novi C. (2000). La leishmaniosi canina. *Summa*, 17(8),43-50.
- Schalling H. D. F. H., Schoone G. J., Beijer E. G. M., Kroon C. C. M., Hommers M., Özbel Y., Özensoy S., da Silva E. S., Cardoso L. M., da Silva E. S. (2002). Development of a fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs. *Veterinary Parasitology*, 109:1-8.
- Solano-Gallego L., Morell P., Arboix M., Alberola J., Ferrer L. (2001). Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(2):560-563.
- Solano-Gallego L., Rodríguez A., Iniesta L., Arboix M., Portús M., Alberola J. (2003). Detection of anti-*Leishmania* immunoglobulin G antibodies in urine specimens of dogs with leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10, 5:849-855.
- Solano-Gallego L., Fernandez-Bellon H., Morell P., Fondevila D., Alberola J., Ramis A., Ferrer L. (2004) Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. *Journal of Comparative Pathology*, 130:7-12.

- Solano-Gallego L., Koutinas A., Mirò G., Cardoso L., Pennisi M.G., Ferrer L., Bourdeau P., Oliva G., Baneth G. (2009) Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, In press.
- Soto M., Requena J. M., Quijada I., Alonso C. (1998). Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 36 (1):58-63.
- Strauss-Ayali D., Jaffe C. L., Burshtain O., Gonen L., Baneth G. (2004). Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *The Journal of Infectious Diseases*, 189:1729-1733.
- Sudhakar S., Srinivas T., Palit^c A., Kar S. K., Battacharya S. K. (2006). Mapping of risk prone areas of kala-azar (*Visceral leishmaniasis*) in parts of Bihar state, India: an RS and GIS approach. *Journal of Vector Borne Diseases*, 43: 115-122.
- Tabar M.D., Roura X., Francino O., Altet L., Ruiz de Gopegui R. (2008). Detection of *Leishmania infantum* by real-time PCR in a canine blood bank. *Journal of Small Animal Practice*, 49:325-328.
- Tafuri W.L., de Lima Santos R., Arantes R. M. E., Gonçalves R., Norma de Melo M., Marques Michalick M. S., Tafuri W. L. (2004) An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *Journal of Immunological Methods*, 292:17-23
- Talmi-Frank D., Strauss-Ayali D., Jaffe C.L., Baneth G. (2006). Kinetics and diagnostic and prognostic potential of quantitative Western Blot analysis and antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assay in experimental canine leishmaniosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(2):271-276.
- Taylor A. E. R.(1987). *IN VITRO METHODS FOR PARASITE CULTIVATION*. Academic press.
- Thrusfield M. (1995). *Veterinary Epidemiology*, second edition. Blackwell Science Ltd, London, UK, pag. 280-282.

- Urquhart G.M., Armour J., Duncan J.L., Dunn A.M., Jennings F.W. (2002). *Parassitologia Veterinaria*. UTET, 2° edizione, Torino.
- Vercammen F., Berkvens D., Le Ray D., Jacquet D, Vervoort T. (1997). Development of a slide ELISA for canine leishmaniasis and comparison with four serological tests. *Veterinary Record*, 141, 331-335.
- Vercammen F., Fernández-Pérez F. J., del Amo C., Alunda J. M. (2002) Follow-up *Leishmania infantum* naturally infected dogs treated with allopurinol: immunofluorescence antibody test, ELISA and Western blot. *Acta Tropica*, 84:175-181.
- Vesco G., Prato F., Vitale F. (1990). La leishmaniosi canina in Sicilia: studio epidemiologico nell'ultimo triennio. Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie, vol XLIV, 27-29 Settembre 1990 Stresa, Abstract Book pag. 157.
- Vio A., Ferroglio E., Cava P.L., Busnelli E., Radanelli D., Rossi L. (2006). Segnalazione di un nuovo focolaio di leishmaniosi canina nel tortonese. *Medicina Veterinaria Preventiva*, 28: 20.
- Xavier S. C., de Andrade H., M., Monte S. J. H., Chiarelli I. M., Lima W. G., Michalick M. S. M., Tafuri W. L., Tafuri W. L. (2006). Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Veterinary Research*, 2:17.
- Yilma e Malone (1998) citato da Rinaldi L., Cascone C., Sibilio G., Musella V., Taddei R., Cringoli G. (2004). I GIG (Geographic Information System) e la tecnologia satellitare nella epidemiologia delle parassitosi. *Parassitologia*, 46: 71-74.
- Zaffaroni E., Rubaudo L., Lanfranchi P., Mignone W. (1999). Epidemiological patterns of canine leishmaniosis in Western Liguria (Italy). *Veterinary Parasitology*, 81:11-19.


- Zaiman H. (1996). Presentation of parasites and the radiology of parasitic diseases. *Tropical Doctor*, 26(2): 81-93.
- Zaragoza C., Barrera R., Centeno F., Tapia J. A., Duràn E., Gonzalez M., Mañé M. C. (2003). SDS-PAGE and Western blot of urinary proteins in dogs with leishmaniosis. *Veterinary Research*, 34: 137-151.

SITI INTERNET (WEB) CONSULTATI:

- www.antropozoonosi.it
- www.leishmania.it
- www.co.cal.md.us

ALLEGATI

Allegato 1

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 1 di 6
	SOP MIPAV SIE 10.01.004	Rev. 1

L'utilizzatore si impegna, una volta ricevuta l'informazione di una nuova revisione del documento, a distruggere la eventuale copia della revisione precedente in suo possesso.

PROVA DI IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA (IFI) PER RICERCA DI IMMUNOGLOBULINE G ANTI - LEISHMANIA INFANTUM IN SIERI DI CANE




- Modificata lista di distribuzione
- Testo eliminato nel sottocapitolo 6.1
- Testo modificato nel sottocapitolo 7.2
- Testo eliminato nel capitolo 10

Lista di distribuzione

Funzione	Nome e Cognome	Firma	Data
Responsabile Servizio MIPAV	Luigi Morganti		
Vice-responsabile Servizio MIPAV	Fabio Ostanello		
Responsabile Ass. Qualità	Emanuele Scalisi		
Responsabile Lab. Sierologia	Raffaella Baldelli		
Ricercatore	Antonietta Di Francesco		
Laureato frequentatore	Silvia Piva		

Preparato	Data	Verificato	Data	Approvato	Data
Raffaella Baldelli	03/10/03	Antonietta Di Francesco	06/10/03	Responsabile Laboratorio SIE	07/10/03


Modulo 05.01 ed.11.03.99

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 2 di 6
	SOP MIPAV SIE 10.01.004	Rev. 1

INDICE

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE
2. RIFERIMENTI
3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI
4. QUALIFICA DEL PERSONALE
5. PARAMETRI AMBIENTALI
6. MATERIALI ED APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE
7. MODALITA' OPERATIVE
8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI (DI PROVA)
9. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA
10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI

Allegato 1: Schema vetrino per immunofluorescenza

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 3 di 6
	SOP MIPAV SIE 10.01.004	Rev. 1

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE.

Diagnosi sierologica ed indagini sieroepidemiologiche per leishmaniosi canina, a scopo di ricerca e/o conto terzi.

2. RIFERIMENTI.

- 2.1 Gradoni L., Gramiccia M. (2000) – Leishmaniosis. In: Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Office International des Epizooties. 4th Ed., Paris-France. Cap.X.1, pp.803-812.
- 2.2 Piergili Fioretti D., Curti M., Vitellozzi G. (1981) – La prova di immunofluorescenza nella diagnosi sierologica della Leishmaniosi canina. Parassitologia, 23, 223-225.
- 2.3 SOP MIPAV 18.01.01 “Addestramento e qualifica del personale non strutturato per le attività dei laboratori di prova”.
- 2.4 SOP MIPAV SIE 10.01.002 “Preparazione antigene leishmania per immunofluorescenza indiretta”.
- 2.5 SOP MIPAV SIE 10.01.003 “Titolazione del coniugato per la prova di immunofluorescenza indiretta”.
- 2.6 SOP MIPAV 10.02.01 “Gestione del sistema di accettazione del Servizio MIPAV”
- 2.7 SOP MIPAV 10.02.02 “Gestione del campione presso il laboratorio di prova”
- 2.8 SOP MIPAV 09.01.01 “Smaltimento dei rifiuti biologici e gestione del materiale contaminato”.
- 2.9 SOP MIPAV 09.01.02 “Gestione della cucina”

3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI.


Coniugato = immunoglobuline anti-IgG di cane coniugate con isotiocianato di fluoresceina
 Titolo (del siero) = massima diluizione del siero alla quale si evidenzia reazione positiva
 Ag = antigene
 Ig = immunoglobuline
 IFI = immunofluorescenza indiretta
 PBS = Phosphate Buffered Saline
 < = inferiore
 ≥ = maggiore o uguale
 ≤ = inferiore o uguale

4. QUALIFICA DEL PERSONALE.

Personale docente, personale tecnico e personale non strutturato afferenti al Laboratorio di Sierologia. Il personale non strutturato dovrà aver superato la prova di addestramento, come previsto dalla SOP MIPAV 18.01.01, ed esser stato autorizzato dal Responsabile del Laboratorio di Sierologia.

5. PARAMETRI AMBIENTALI.

NA

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 4 di 6
	SOP MIPAV SIE 10.01.004	Rev. 1

6. MATERIALI ED APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE.

6.1 Reagenti

- NaCl (min. 99%)
- Na₂HPO₄ (min. 99%)
- KH₂PO₄ (min. 99%)
- immunoglobuline anti-IgG (H+L) di cane, coniugate con isotiocianato di fluoresceina
- blu d'Evans 1%
- glicerina tamponata [testo eliminato]
- H₂O deionizzata
- Ag *Leishmania infantum*, preparato e conservato con le modalità descritte nella SOP MIPAV SIE 10.01.002
- siero di controllo positivo: siero di cane contenente IgG anti-leishmania, a titolo noto in IFI $\geq 1:80$
- siero di controllo negativo: siero di cane con titolo IgG $< 1:80$ in IFI.

6.2 Strumentario

- agitatore magnetico
- agitatore per provette tipo vortex
- bilancia analitica (prec. 1 mg)
- congelatore ($-20^{\circ}\text{C} \pm 3$)
- microscopio a fluorescenza Leitz Diaplan dotato di sistema a luce incidente con obiettivo NPL Fluotar 40/0,70
- pHmetro ($\pm 0,05\%$)
- termostato ($37^{\circ}\text{C} \pm 1$)
- cilindro graduato di vetro capacità 1 litro
- matraccio di vetro capacità 1 litro
- provette di vetro 12 x 100-120 mm
- pipette di vetro classe B 2 ml
- propipettatore
- micropipette a volume variabile da 5-40 μl e 40-200 μl
- puntali monouso da 5-200 μl
- vetrini per immunofluorescenza resistenti all'acetone con 10 anelli di 6 mm di diametro sui quali è stato fissato l'Ag *Leishmania* secondo le modalità descritte nella SOP MIPAV SIE 10.01.002
- vetrini coprioggetto
- camera umida
- contenitori di vetro per lavaggio vetrini

7. MODALITÀ OPERATIVE.

7.1 Procedure preliminari

- Preparazione PBS: pesare 7,650 g di NaCl + 0,724 g di Na₂HPO₄ + 0,210 g di KH₂PO₄, portare al volume di 1 litro con H₂O deionizzata, sciogliere su agitatore magnetico e pHare controllando che il range di pH sia di 7,2-7,4.

Modulo 05.01 ed.11.03.99

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 5 di 6
	SOP MIPAV SIE 10.01.004	Rev. 1

- Preparare gli schemi dei vetrini, riproducenti gli anelli dei vetrini per immunofluorescenza (vedi allegato 1), riportando il numero di identificazione del siero in esame e, per ogni anello, le diluizioni dello stesso. Riportare inoltre su ciascuno schema la data di esecuzione della prova, il numero progressivo del vetrino e la sigla dell'operatore.
- Togliere i vetrini dal congelatore, lasciarli a temperatura ambiente per 10 min circa, sciacquarli con H₂O deionizzata e lasciarli asciugare a temperatura ambiente.

7.2 Prova a screening

- Allestire in provetta, per ciascun siero in esame, due diluizioni in PBS pH 7,2-7,4, pari a 1:40 e 1:80; allestire in provetta una diluizione pari a 1:80 del siero di controllo positivo e del siero di controllo negativo.
- Collocare i vetrini in camera umida.
- Dispensare 25 µl delle diluizioni 1:40 e 1:80 di ciascun siero in esame negli specifici anelli del vetrino e predisporre un anello per il controllo positivo (25 µl siero positivo), un anello per il controllo negativo (25 µl siero negativo) e un anello per il controllo Ag (25 µl PBS).
- Incubare in termostato a 37°C per 30 min.
- Lavare i vetrini in PBS pH 7,2-7,4 in appositi contenitori: 3 lavaggi rapidi seguiti da 2 lavaggi di 10 min per immersione. Sciacquare i vetrini in H₂O deionizzata.
- Lasciare asciugare i vetrini a temperatura ambiente.
- Collocare i vetrini in camera umida.
- Dispensare in tutti gli anelli 25 µl di coniugato alla diluizione d'uso (vedi SOP MIPAV SIE 10.01.003), addizionato con blu d'Evans 1:10.000.
- Incubare in termostato a 37°C per 30 min.
- Lavare i vetrini in PBS pH 7,2-7,4 in appositi contenitori: 3 lavaggi rapidi seguiti da 2 lavaggi di 10 min per immersione. Sciacquare i vetrini in H₂O deionizzata.
- Lasciare asciugare i vetrini a temperatura ambiente.
- Dispensare in ciascun anello una goccia di glicerina tamponata e coprire i vetrini con vetrino coprioggetto.
- Leggere i vetrini al microscopio a fluorescenza con obiettivo 40/0,70: la positività della reazione è indicata da fluorescenza giallo-verdastra delle leishmanie, su fondo scuro.

7.3 Prova a diluizione

Nella prova a diluizione vengono saggiati i sieri risultati positivi nella prova a screening alla diluizione di 1:80.


Di ogni siero vengono saggiate, secondo le modalità descritte al punto 7.2, diluizioni per raddoppio, a partire dalla diluizione pari a 1:40, fino al raggiungimento del titolo.

8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI (DI PROVA).

Si considera positivo un siero che mostri reazione positiva ad una diluizione $\geq 1:80$.

I risultati vengono riportati sul Registro Campioni del Laboratorio di Sierologia, con l'indicazione, in caso di positività, del titolo del siero (SOP MIPAV 10.02.02).

Rapporto di prova viene compilato secondo quanto previsto dalla SOP MIPAV 10.02.01, relativamente a prestazioni conto terzi; per quanto riguarda i risultati relativi a campioni

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 6 di 6
	SOP MIPAV SIE 10.01.004	Rev. 1


esaminati a scopo di ricerca, questi vengono comunicati con modalità variabili con la tipologia della ricerca.

9. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA.

NA

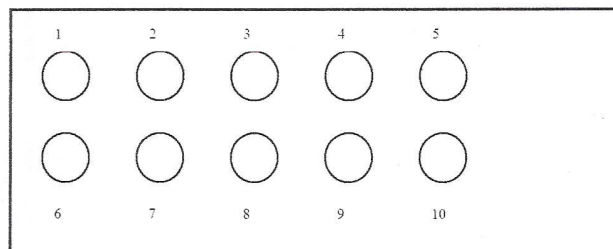
10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI.

I puntali e i vetrini vengono raccolti, trattati e smaltiti come materiale contaminato non riciclabile (SOP MIPAV 09.01.01). Le provette di vetro, utilizzate per le diluizioni dei sieri e del coniugato, [testo eliminato] vengono avviate agli opportuni trattamenti previsti dalla SOP MIPAV 09.01.02. La restante vetreria utilizzata viene raccolta come materiale non contaminato riciclabile ed avviata ai trattamenti previsti dalla SOP MIPAV 09.01.02. I contenitori utilizzati per i lavaggi dei vetrini vengono sottoposti a ripetuti lavaggi con acqua corrente, seguiti da un ultimo risciacquo in H₂O deionizzata.

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Allegato 1 Pag. 1 di 1
	SOP MIPAV SIE 10.01.004	Rev. 0

ALLEGATO 1


Schema vetrino per immunofluorescenza



A

II

Allegato 2

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 1 di 6
	SOP MIPAV SIE 10.01.001	Rev. 0

L'utilizzatore si impegna, una volta ricevuta l'informazione di una nuova revisione del documento, a distruggere la eventuale copia della revisione precedente in suo possesso.


MODALITÀ DI COLTURA DELLE LEISHMANIE

Lista di distribuzione

Funzione	Nome e Cognome	Firma	Data
Responsabile Servizio MIPAV	Luigi Morganti		
Vice-responsabile Servizio MIPAV	Fabio Ostanello		
Responsabile Ass. Qualità	Emanuele Scalisi		
Responsabile Lab. Sierologia	Raffaella Baldelli		
Tecnico di laboratorio	Antonietta Di Francesco		
Dottorando di ricerca	Emanuela Mollicone		


Preparato	Data	Verificato	Data	Approvato	Data
Antonietta Di Francesco	14/05/02	Emanuela Mollicone	03/06/02	Responsabile Laboratorio SIE	04/06/02

Modulo 05.01 ed.11.03.99

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 2 di 6
	SOP MIPAV SIE 10.01.001	Rev. 0

INDICE

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE
2. RIFERIMENTI
3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI
4. QUALIFICA DEL PERSONALE
5. PARAMETRI AMBIENTALI
6. MATERIALI ED APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE
7. MODALITA' OPERATIVE
8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI (DI PROVA)
9. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA
10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 3 di 6
	SOP MIPAV SIE 10.01.001	Rev. 0

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE.

Coltura di leishmanie da utilizzare come antigene nella reazione di immunofluorescenza indiretta.

2. RIFERIMENTI.

2.1 Evans D.A. (1987) – *Leishmania*. In: Taylor A.E.R., Baker J.R.: *In vitro* methods for parasite cultivation. Academic Press, London, pp.59-.

2.2 Gradoni L., Gramiccia M. (2000) – Leishmaniosis. In: Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Office International des Epizooties. 4th Ed., Paris-France. Cap.X.1, pp.803-812.

2.3 SOP MIPAV 18.01.01 “Addestramento e qualifica del personale non strutturato per le attività dei laboratori di prova”.

2.4 SOP MIPAV 09.01.01 “Smaltimento dei rifiuti biologici e gestione del materiale contaminato”.

2.5 SOP MIPAV 09.01.02 “Gestione della cucina”

3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI.

EMTM = Tobie medium modified by Evans

PBS = Phosphate Buffered Saline

TRIS = Trishydroxymethylaminomethane

≤ = inferiore o uguale

4. QUALIFICA DEL PERSONALE.

Personale docente, personale tecnico e personale non strutturato afferenti al Laboratorio di Sierologia. Il personale non strutturato dovrà aver superato la prova di addestramento, come previsto dalla SOP MIPAV 18.01.01, ed esser stato autorizzato dal Responsabile del Laboratorio di Sierologia.

5. PARAMETRI AMBIENTALI.


NA

6. MATERIALI ED APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE.

6.1 Reagenti

- agar
- peptone da batteriologia
- estratto di carne
- H₂O deionizzata
- NaCl (min. 99%)
- Na₂HPO₄ (min. 99%)
- KH₂PO₄ (min. 99%)
- KCl (min. 99%)

Modulo 05.01 ed.11.03.99

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 4 di 6
	SOP MIPAV SIE 10.01.001	Rev. 0

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (min. 99%)
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (min. 99%)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (min. 99%)
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (min. 99%)
- L-prolina (min. 99%)
- $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ (TRIS) (min. 99,9%)
- gentamicina solfato (circa 600 µg/mg)
- siero fetale bovino
- sangue di coniglio defibrinato
- ceppo di riferimento OMS di *Leishmania infantum* (MHOM/TN/80/IPT1), fornito dall'Istituto Superiore di Sanità di Roma


6.2 Strumentario

- agitatore magnetico
- autoclave
- agitatore per provette tipo vortex
- bagnomaria ($48^\circ\text{C} \pm 1$)
- bilancia analitica (prec. 1 mg)
- congelatore ($-20^\circ\text{C} \pm 3$)
- frigorifero ($5^\circ\text{C} \pm 3$)
- microscopio ottico obiettivo 40 ×
- pHmetro ($\pm 0,05\%$)
- termostato ($23^\circ\text{C} \pm 1$)
- termostato ($37^\circ\text{C} \pm 1$)
- becher di vetro da 1 litro
- cilindro graduato di vetro da 100 ml
- cilindro graduato di vetro da 1 litro
- matracci di vetro da 250 ml
- filtri sterili da siringa da 0,20 µ
- pipette di vetro classe B 10 ml $\pm 0,1$
- pipette di vetro classe B 2 ml sterili o pipette 2ml monouso sterili
- pipette pasteur di vetro sterili
- propipettatore
- provette di vetro da minimo 10 ml, con tappo a vite
- provette di vetro 16 × 160 mm, con tappo cap-o-test
- inclinatore in acciaio per provette
- vetrini portaoggetto
- vetrini coprioggetto

7. MODALITÀ OPERATIVE.

7.1 Preparazione del terreno di coltura: terreno EMTM

7.1.1 Preparazione della fase solida

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 5 di 6
	SOP MIPAV SIE 10.01.001	Rev. 0

- Misurare in un cilindro graduato circa 100 ml di H₂O deionizzata e travasarli in parte in un matraccio da 250 ml.
- Pesare 0,8 g di NaCl, 0,5 g di peptone da batteriologia e 0,3 g di estratto di carne; trasferirli nel matraccio in cui si aggiungerà la restante H₂O deionizzata fino ad un volume finale di 100 ml.
- Aggiungere nel matraccio 2 g di agar.
- Sciogliere la soluzione a bagnomaria e distribuirne 3 ml in provette di vetro 16 × 160 mm con tappo cap-o-test.
- Autoclavare le provette a 121°C per 15 min.
- Conservare il terreno in frigorifero per un periodo di tempo massimo di 1 anno.

7.1.2 Preparazione della fase liquida

- Misurare in un cilindro graduato circa 500 ml di H₂O deionizzata e travasarne una parte in un becher.
- Eseguire su bilancia analitica le seguenti pesate.


KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	0,03 g
KH ₂ PO ₄	0,03 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,0925 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,05 g
MgCl ₂ 6H ₂ O	0,05 g
NaCl	4 g
L-prolina	0,5 g
- Sciogliere i reagenti nell'acqua deionizzata presente nel becher e quindi aggiungere la restante H₂O deionizzata fino al volume finale di 500 ml.
- pHare e aggiustare il pH a 7,2 con una soluzione di TRIS 0,05 M (0,606 g di C₄H₁₁NO₃/100 ml di H₂O deionizzata).
- Distribuire un volume di 5 ml in provette di vetro con tappo a vite.
- Autoclavare le provette a 121°C per 15 min.
- Conservare il terreno in frigorifero per un periodo di tempo massimo di 1 anno.

7.1.3 Preparazione della fase liquida completa

- Preparazione PBS: pesare 0,765 g di NaCl + 0,072 g di Na₂HPO₄ + 0,021 g di KH₂PO₄, portare al volume di 100 ml con H₂O deionizzata, sciogliere su agitatore magnetico e pHare controllando che il range di pH sia di 7,2-7,4; sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 min.
- Diluire la gentamicina solfato in PBS: 2,5 mg/ml di PBS sterile, filtrare attraverso filtri da 0,20 µ e conservare in aliquote in congelatore per massimo 6 mesi.
- Al momento dell'uso completare la fase liquida con l'aggiunta di siero fetale bovino (5%) e di gentamicina solfato diluita (10%): 4,25 ml di fase liquida + 0,25 ml di siero fetale bovino + 0,50 ml di gentamicina diluita.

7.1.4 Aggiunta di sangue defibrinato di coniglio alla fase solida

- Sciogliere a bagnomaria le provette contenenti il terreno in fase solida e collocarle in bagnomaria a 48°C per mantenere il terreno in fase liquida.
- Distribuire, in condizioni di sterilità, 0,45 ml di sangue di coniglio, defibrinato meccanicamente, in ciascuna provetta, che verrà poi agitata su vortex e collocata in

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 6 di 6
	SOP MIPAV SIE 10.01.001	Rev. 0

posizione inclinata in apposito supporto in modo che il terreno solidifichi a becco di clarino.

- Eseguire controllo di sterilità mediante incubazione di una provetta in termostato a 37°C per 48 ore: eliminare tutto il lotto di terreno in caso di crescita batterica e/o fungina.
- Conservare in frigorifero per un periodo di tempo massimo di 60 giorni.

7.2 Trapianto di leishmanie

- Prelevare, da una coltura di *L. infantum*, con pipetta pasteur vetro sterile, in condizioni di sterilità, qualche goccia di sospensione di leishmanie e depositarne 2 gocce su di un vetrino; coprire con vetrino coprioggetto e osservare al microscopio ottico con obiettivo 40 ×, al fine di controllare che la vitalità e il numero di leishmanie (almeno 10 per campo) siano idonei al trapianto.
- Dispensare, con pipetta sterile, in condizioni di sterilità, 2 ml di terreno in fase liquida completa in una provetta contenente la fase solida addizionata di sangue di coniglio.
- Prelevare sterilmente con pipetta pasteur sterile qualche goccia della sospensione di leishmanie, trasferirla nel terreno di cui al punto precedente che verrà poi posto in termostato a 23°C.
- Ripetere il trapianto ogni 7-10 giorni, a seconda della velocità di crescita delle leishmanie.

8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI (DI PROVA).

NA.


9. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA.

Uso di guanti a perdere durante tutte le fasi relative alla manipolazione delle leishmanie.

10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI.

Le pipette pasteur devono essere raccolte e smaltite come materiale contaminato trattato chimicamente, non riciclabile (SOP MIPAV 09.01.01). I vetrini utilizzati per il controllo della crescita delle leishmanie vengono raccolti e trattati come materiale contaminato trattato chimicamente, riciclabile (SOP MIPAV 09.01.02). Le provette utilizzate per la coltura delle leishmanie vengono raccolte e trattate come materiale contaminato riciclabile (SOP MIPAV 09.01.01). La restante vetreria utilizzata viene raccolta come materiale non contaminato riciclabile ed avviata ai trattamenti previsti dalla SOP MIPAV 09.01.02.

Allegato 3

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 1 di 5
	SOP MIPAV SIE 10.01.002	Rev. 0

L'utilizzatore si impegna, una volta ricevuta l'informazione di una nuova revisione del documento, a distruggere la eventuale copia della revisione precedente in suo possesso.


PREPARAZIONE ANTIGENE *LEISHMANIA* PER IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA

Lista di distribuzione

Funzione	Nome e Cognome	Firma	Data
Responsabile Servizio MIPAV	Luigi Morganti		
Vice-responsabile Servizio MIPAV	Fabio Ostanello		
Responsabile Ass. Qualità	Emanuele Scalisi		
Responsabile Lab. Sierologia	Raffaella Baldelli		
Tecnico di laboratorio	Antonietta Di Francesco		
Dottorando di ricerca	Emanuela Mollicone		


Preparato	Data	Verificato	Data	Approvato	Data
Antonietta Di Francesco	15/05/02	Raffaella Baldelli	30/05/02	Responsabile Laboratorio SIE	04/06/02

Modulo 05.01 ed.11.03.99

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 2 di 5
	SOP MIPAV SIE 10.01.002	Rev. 0

INDICE

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE
2. RIFERIMENTI
3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI
4. QUALIFICA DEL PERSONALE
5. PARAMETRI AMBIENTALI
6. MATERIALI ED APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE
7. MODALITA' OPERATIVE
8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI (DI PROVA)
9. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA
10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 3 di 5
	SOP MIPAV SIE 10.01.002	Rev. 0

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE.

Preparazione dell'antigene *Leishmania* da utilizzare nella reazione di immunofluorescenza indiretta.

2. RIFERIMENTI.

- 2.1 Gradoni L., Gramiccia M. (2000) – Leishmaniosis. In: Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Office International des Epizooties. 4th Ed., Paris-France. Cap.X.1, pp.803-812.
- 2.2 Piergili Fioretti D., Curti M., Vitellozzi G. (1981) – La prova di immunofluorescenza nella diagnosi sierologica della Leishmaniosi canina. Parassitologia, 23, 223-225.
- 2.3 SOP MIPAV 18.01.01 "Addestramento e qualifica del personale non strutturato per le attività dei laboratori di prova".
- 2.4 SOP MIPAV SIE 10.01.001 "Modalità di coltura delle leishmanie".
- 2.5 SOP MIPAV 09.01.01 "Smaltimento dei rifiuti biologici e gestione del materiale contaminato".
- 2.6 SOP MIPAV 09.01.02 "Gestione della cucina"
- 2.7 SOP FT 09.01.01 "Smaltimento dei rifiuti di laboratorio di tipo chimico classificati come pericolosi prodotti nel Servizio di Prova di FT"

3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI.

Ag = antigene
 PBS = Phosphate Buffered Saline
 rpm = rotazioni per minuto
 ≤ = inferiore o uguale.

4. QUALIFICA DEL PERSONALE.

Personale docente, personale tecnico e personale non strutturato afferenti al Laboratorio di Sierologia. Il personale non strutturato dovrà aver superato la prova di addestramento, come previsto dalla SOP MIPAV 18.01.01, ed esser stato autorizzato dal Responsabile del Laboratorio di Sierologia.

5. PARAMETRI AMBIENTALI.


NA

6. MATERIALI ED APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE.

6.1 Reagenti

- NaCl (min. 99%)
- Na₂HPO₄ (min. 99%)
- KH₂PO₄ (min. 99%)
- acetone (min. 99%)
- H₂O deionizzata
- coltura di leishmanie (SOP MIPAV SIE 10.01.001)

Modulo 05.01 ed.11.03.99

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 4 di 5
	SOP MIPAV SIE 10.01.002	Rev. 0


- blu di metilene

6.2 Strumentario

- agitatore magnetico
- agitatore per provette tipo vortex
- autoclave
- bilancia analitica (prec. 1 mg)
- centrifuga
- congelatore ($-20^{\circ}\text{C} \pm 3$)
- microscopio ottico con obiettivo $40\times$
- pHmetro ($\pm 0,05\%$)
- termostato ($37^{\circ}\text{C} \pm 1$).
- cilindro graduato di vetro capacità 500 ml
- matraccio di vetro capacità 1 litro
- provette di vetro coniche graduate capacità 15 ml sterili, con tappo
- pipette di vetro classe B 10 ml $\pm 0,1$ sterili o pipette 10 ml monouso sterili
- pipette pasteur di vetro sterili
- micropipette a volume variabile da 5-40 μl
- puntali monouso da 5-200 μl
- vetrini portaoggetto
- vetrini coprioggetto
- vetrini per immunofluorescenza resistenti all'acetone con 10 anelli di 6 mm di diametro
- contenitori in vetro per vetrini
- contenitori per conservazione vetrini

7. MODALITÀ OPERATIVE.

- Preparazione PBS: pesare 3,825 g di NaCl + 0,362 g di Na_2HPO_4 + 0,105 g di KH_2PO_4 , portare al volume di 500 ml con H_2O deionizzata, sciogliere su agitatore magnetico, pHare controllando che il range di pH sia di 7,2-7,4 e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 min.
- Prelevare con pipetta pasteur sterile il liquido di coltura delle leishmanie (SOP MIPAV SIE 10.01.001), dopo aver accertato al microscopio la buona crescita dei promastigoti; trasferirlo quindi in provetta conica graduata sterile, aggiungendo uguale volume di PBS sterile pH 7,2-7,4.
- Centrifugare a 2.000 rpm per 10 min.
- Togliere tutto il surnatante, sostituirlo con uguale volume di PBS sterile pH 7,2-7,4, agitare su vortex e centrifugare di nuovo a 2.000 rpm per 10 min. Ripetere l'operazione 3 volte.
- Togliere tutto il surnatante, risospendere il pellet aggiungendo uguale volume di PBS e agitando su vortex.
- Distribuire con pipetta pasteur sterile una goccia della sospensione su un vetrino portaoggetto, coprire con vetrino coprioggetto, valutare la concentrazione di leishmanie al microscopio con obiettivo $40\times$ e aggiungere, se necessario, PBS sterile pH 7,2-7,4 alla sospensione, fino ad osservare circa una decina di leishmanie per campo visivo.

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 5 di 5
	SOP MIPAV SIE 10.01.002	Rev. 0

- Prelevare con pipetta pasteur sterile una goccia della sospensione, dispensarla su un vetrino portaoggetto, lasciarla asciugare e colorarla con blu di metilene per 3 min. Controllare di nuovo la concentrazione di leishmanie al microscopio con obiettivo 40 x. La concentrazione ottimale è quella alla quale si evidenziano circa 15 leishmanie per campo visivo.
- Distribuire 10 µl di tale sospensione in tutti gli anelli dei vetrini per immunofluorescenza.
- Lasciare asciugare i vetrini a temperatura ambiente.
- Fissare i vetrini per 15 min all'interno di contenitori di vetro contenenti acetone precedentemente refrigerato.
- Lasciare asciugare i vetrini all'aria per circa 10 min e conservarli in appositi contenitori in congelatore a – 20 °C per un periodo massimo di tre mesi.

8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI (DI PROVA).

NA.

9. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA.

Uso di guanti a perdere durante le fasi di manipolazione delle leishmanie.


10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI.

L'acetone viene smaltito con le modalità previste nella SOP FT 09.01.01.

Le pipette pasteur devono essere raccolte e smaltite come materiale contaminato trattato chimicamente, non riciclabile (SOP MIPAV 09.01.01). I vetrini utilizzati per il controllo delle leishmanie vengono raccolti e trattati come materiale contaminato trattato chimicamente, riciclabile (SOP MIPAV 09.01.02). I puntali monouso vengono raccolti e smaltiti come materiale contaminato non riciclabile (SOP MIPAV 09.01.01). La vetreria contaminata da leishmanie viene raccolta e trattata come materiale contaminato riciclabile (SOP MIPAV 09.01.01). La restante vetreria utilizzata viene raccolta come materiale non contaminato riciclabile ed avviata ai trattamenti previsti dalla SOP MIPAV 09.01.02.

I contenitori utilizzati per il fissaggio dell'Ag ai vetrini vengono sottoposti a ripetuti lavaggi con acqua corrente, seguiti da un ultimo risciacquo in H₂O deionizzata.

Allegato 4

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 1 di 5
	SOP MIPAV SIE 10.01.003	Rev. 1

L'utilizzatore si impegna, una volta ricevuta l'informazione di una nuova revisione del documento, a distruggere la eventuale copia della revisione precedente in suo possesso.

TITOLAZIONE DEL CONIUGATO PER LA PROVA DI IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA (IFI)




- Modificata lista di distribuzione
- Testo eliminato nel sottocapitolo 6.1
- Testo modificato nel capitolo 7
- Testo eliminato nel capitolo 10

Lista di distribuzione

Funzione	Nome e Cognome	Firma	Data
Responsabile Servizio MIPAV	Luigi Morganti		
Vice-responsabile Servizio MIPAV	Fabio Ostanello		
Responsabile Ass. Qualità	Emanuele Scalisi		
Responsabile Lab. Sierologia	Raffaella Baldelli		
Ricercatore	Antonietta Di Francesco		
Laureato frequentatore	Silvia Piva		

Preparato	Data	Verificato	Data	Approvato	Data
Raffaella Baldelli	03/10/03	Antonietta Di Francesco	06/10/03	Responsabile Laboratorio SIE	07/10/03


Modulo 05.01 ed.11.03.99

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 2 di 5
	SOP MIPAV SIE 10.01.003	Rev. 1

INDICE

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE
2. RIFERIMENTI
3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI
4. QUALIFICA DEL PERSONALE
5. PARAMETRI AMBIENTALI
6. MATERIALI ED APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE
7. MODALITA' OPERATIVE
8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI (DI PROVA)
9. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA
10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI

Allegato 1: Schema vetrino per immunofluorescenza

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 3 di 5
	SOP MIPAV SIE 10.01.003	Rev. 1

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE.

Determinazione della diluizione d'uso del coniugato fluorescente da utilizzare nelle reazioni di immunofluorescenza indiretta

2. RIFERIMENTI.

2.1 SOP MIPAV 18.01.01 "Addestramento e qualifica del personale non strutturato per le attività dei laboratori di prova".

2.2 SOP MIPAV 09.01.01 "Smaltimento dei rifiuti biologici e gestione del materiale contaminato".

2.3 SOP MIPAV 09.01.02 "Gestione della cucina"

3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI.

Coniugato = immunoglobuline anti-isotipo di specie coniugate con isotiocianato di fluoresceina

Titolo (del siero) = massima diluizione del siero alla quale si evidenzia reazione positiva

Ag = antigene

IFI = immunofluorescenza indiretta

PBS = Phosphate Buffered Saline.

4. QUALIFICA DEL PERSONALE.

Personale docente, personale tecnico e personale non strutturato afferenti al Laboratorio di Sierologia. Il personale non strutturato dovrà aver superato la prova di addestramento, come previsto dalla SOP MIPAV 18.01.01, ed esser stato autorizzato dal Responsabile del Laboratorio di Sierologia.


5. PARAMETRI AMBIENTALI.

NA

6. MATERIALI ED APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE.

6.1 Reagenti

- NaCl (min. 99%)
- Na₂HPO₄ (min. 99%)
- KH₂PO₄ (min. 99%)
- immunoglobuline anti-isotipo di specie, coniugate con isotiocianato di fluoresceina
- blu d'Evans 1%
- glicerina tamponata [testo eliminato]
- H₂O deionizzata
- Ag
- siero di controllo positivo: siero, appartenente alla specie verso cui è diretto il coniugato, contenente immunoglobuline anti-Ag a titolo noto in IFI e comunque con titolo superiore alla soglia di positività stabilita per quel determinato Ag in IFI

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 4 di 5
	SOP MIPAV SIE 10.01.003	Rev. 1

- siero di controllo negativo: siero, appartenente alla specie verso cui è diretto il coniugato, contenente immunoglobuline anti-Ag con titolo inferiore alla soglia di positività stabilita per quel determinato Ag in IFI.


6.2 Strumentario

- agitatore magnetico
- agitatore per provette tipo vortex
- bilancia analitica (prec. 1 mg)
- congelatore ($-20^{\circ}\text{C} \pm 3$)
- microscopio a fluorescenza Leitz Diaplan dotato di sistema a luce incidente con obiettivo NPL Fluotar 40/0,70.
- pHmetro ($\pm 0,05\%$)
- termostato ($37^{\circ}\text{C} \pm 1$)
- cilindro graduato di vetro capacità 1 litro
- matraccio di vetro capacità 1 litro
- provette di plastica monouso da 3 ml, munite di tappo (da utilizzare per diluire sieri umani)
- provette di vetro 12×100 -120 mm
- pipette di vetro classe B 2 ml
- propipettatore
- micropipette a volume variabile da 5-40 μl e 40-200 μl
- puntali monouso da 5-200 μl
- vetrini per immunofluorescenza resistenti all'acetone con 10 anelli di 6 mm di diametro sui quali è fissato l'Ag
- vetrini coprioggetto
- camera umida
- contenitori in vetro per lavaggio vetrini

7. MODALITÀ OPERATIVE.

- Preparazione PBS: pesare 7,650 g di NaCl + 0,724 g di Na_2HPO_4 + 0,210 g di KH_2PO_4 , portare al volume di 1 litro con H_2O deionizzata, sciogliere su agitatore magnetico e pHare controllando che il range di pH sia di 7,2-7,4.
- Allestire i vetrini con l'Ag, con le specifiche descritte per ogni singola particolare applicazione.
- Preparare lo schema di distribuzione delle diluizioni del siero positivo di controllo negli anelli dei vetrini: utilizzare un vetrino per ogni diluizione del coniugato da saggiare (vedi allegato 1).
- Allestire in provetta diluizioni per raddoppio in PBS pH 7,2-7,4 del siero positivo di controllo, fino a raggiungere la diluizione superiore al titolo noto; allestire in provetta una diluizione del siero di controllo negativo, superiore al titolo soglia.
- Collocare i vetrini in camera umida.
- Dispensare 25 μl di ciascuna diluizione del siero positivo di controllo nello specifico anello di ogni vetrino, partendo dalla diluizione più alta, e predisporre in ciascun vetrino un anello per il controllo negativo (25 μl siero negativo) e un anello per il controllo Ag (25 μl PBS).

Modulo 05.01 ed.11.03.99

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 5 di 5
	SOP MIPAV SIE 10.01.003	Rev. 1

- Incubare in termostato a 37°C per 30 min.
- Lavare i vetrini in PBS pH 7,2-7,4 in appositi contenitori: 3 lavaggi rapidi seguiti da 2 lavaggi di 10 min per immersione. Sciacquare i vetrini in H₂O deionizzata.
- Lasciare asciugare i vetrini a temperatura ambiente.
- Allestire in provetta diluizioni per raddoppio, in PBS pH 7,2-7,4, del coniugato a partire da 1/10, e aggiungere a ciascuna di esse blu d'Evans 1:10.000
- Collocare i vetrini in camera umida.
- Dispensare in tutti gli anelli 25 µl di coniugato, destinando un vetrino a ciascuna diluizione.
- Incubare in termostato a 37°C per 30 min.
- Lavare i vetrini in PBS pH 7,2-7,4 in appositi contenitori: 3 lavaggi rapidi seguiti da 2 lavaggi di 10 min per immersione. Sciacquare i vetrini in H₂O deionizzata.
- Lasciare asciugare i vetrini a temperatura ambiente.
- Dispensare in ciascun anello una goccia di glicerina tamponata e coprire i vetrini con vetrino coprioggetto.
- Leggere i vetrini al microscopio a fluorescenza con obiettivo 40/0,70: la positività della reazione è indicata da fluorescenza giallo-verdastra dell'Ag, su fondo scuro.

8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI (DI PROVA).

La diluizione d'uso (titolo) del coniugato è rappresentata dalla massima diluizione del coniugato in grado di dare reazione positiva fino alla diluizione pari al titolo del siero di controllo positivo. Tale diluizione d'uso viene riportata sul contenitore nel quale viene stoccato a -20°C il coniugato titolato e suddiviso in aliquote.

9. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA.

Uso di guanti a perdere qualora si manipolino sieri umani .

10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI.

I puntali, i vetrini e le provette di plastica vengono raccolti, trattati e smaltiti come materiale contaminato non riciclabile (SOP MIPAV 09.01.01). Le provette di vetro, utilizzate per le diluizioni dei sieri e del coniugato, [testo eliminato] vengono avviate agli opportuni trattamenti previsti dalla SOP MIPAV 09.01.02. La restante vetreria utilizzata viene raccolta come materiale non contaminato riciclabile ed avviata ai trattamenti previsti dalla SOP MIPAV 09.01.02. I contenitori utilizzati per i lavaggi dei vetrini vengono sottoposti a ripetuti lavaggi con acqua corrente, seguiti da un ultimo risciacquo in H₂O deionizzata.

Ringraziamenti

In quattro anni alcune cose sono molto cambiate, ma altre, le mie certezze, no... sono sempre lì, immutevoli.

Anche il raggiungimento di questo mio traguardo è stato un lavoro di squadra, la migliore con la quale si possa giocare: la mia famiglia.

Non c'è stata mai una difficoltà o un ostacolo che non sia stato superato insieme, mai un pensiero negativo ha offuscato per più di qualche attimo la mia mente, perché ho sempre potuto, e potrò nella mia vita, contare sui miei genitori, insostituibili ed inesauribili maestri di vita:

la mia forza, i miei pilastri, la mia linfa vitale.

Non dimentico mia sorella, che questa volta ha fatto sentire la sua presenza nei fine settimana con frasi di incoraggiamento del tipo “ma non la finisci più ‘sta tesi?”. A parte la nota ironica, la ringrazio per essere sempre nella mia vita come una delicata carezza, leggera ma presente.

Che dire della nonna?!? Ha sostituito i pocket coffee con le ricariche per il cellulare, ma fa sempre sentire il suo affetto.

A parte la mia famiglia sono tante le persone che vorrei ringraziare; tutte hanno dato qualcosa alla mia vita in questi anni: Silvia, la mia “collega” (ma molto molto di più...) preferita, Cri, il sorriso del Dipartimento, Sara, piacevole scoperta, Maria, la new entry, Antonella, il mio “co-capo”, Maria Rosaria, amica di una vita, Rossana, la mia “commare”, Matteo, il mio “cognatino”, e tanti altri...

Voglio ringraziare anche il personale del Laboratorio di Parassitologia della Facoltà di Farmacia dell'Università di Barcellona, che ha reso possibile ed estremamente piacevole una delle parti sperimentali di questa tesi.

Un sentito grazie va al Dott. Brianti, senza la cui collaborazione non sarebbe stato possibile realizzare una parte importante di questo lavoro.

Ringrazio la Dott.ssa Stancampiano, utile sostegno nell'elaborazione statistica dei dati.

Ringrazio per ultima una persona speciale, ormai fondamentale nella mia vita, con la quale spero di condividere tutto quello che di bello ci potrà essere nel nostro futuro. Sono certa che sarà al mio fianco in ogni momento della mia vita con la sua dolcezza, la sua sensibilità, la sua simpatia e la sua rettitudine, che non ho mai trovato così forte in nessuna persona.

Grazie B.

E come di consueto... un impercettibile, sussurrato, insignificante grazie...a me!!!